

PARENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

| | |
|--|---|
| Date of mailing: 01 May 1997 (01.05.97) | To: United States Patent and Trademark Office (Box PCT) Crystal Plaza 2 Washington, DC 20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office |
| International application No.: PCT/AU96/00668 | Applicant's or agent's file reference: PN6135 EJH/EK |
| International filing date: 23 October 1996 (23.10.96) | Priority date: 23 October 1995 (23.10.95) |
| Applicant: WILLSON, Tracy et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

 in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

16 April 1997 (16.04.97)

 in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 730.91.11 |
|---|---|

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference PN6135 EJH/EK | FOR FURTHER ACTION | see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below. |
| International application No. PCT/AU 96/00668 | International filing date (day/month/year) 23 October 1996 | (Earliest) Priority Date (day/month/year) 23 October 1995 |
| <p>Applicant</p> <p>(1) AMRAD OPERATIONS PTY LTD (2) WILLSON T., NICOLA NA., HILTON DJ, METCALF D, ZANG JG.</p> | | |

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Certain claims were found unsearchable (See Box I)
2. Unity of invention is lacking (See Box II)
3. The international application contains disclosure of a nucleotide and/or amino acid sequence listing and the international search was carried out on the basis of the sequence listing
 - filed with the international application
 - furnished by the applicant separately from the international application,
 - but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed
 - transcribed by this Authority
4. With regard to the title, the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the abstract,
 - the text is approved as submitted by the applicant
 - the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. The figure of the drawings to be published with the abstract is:

Figure No.

 - as suggested by the applicant.
 - because the applicant failed to suggest a figure
 - because this figure better characterises the invention
 - None of the figures

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int Cl⁶: C12N 15/12, 5/06; C07K 14/715, 16/28, 19/00; A16K 38/16, 48/00; G01N 33/566, 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, C07K, A61K, G01N, CHEMICAL ABSTRACTSDocumentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
STN, UPSM, MEDLINEElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CHEMICAL ABSTRACTS, WPAT, JAPIO, UPSM - KEYWORDS INCLUDE
INTERLEUKIN()13()RECEPTOR, INTERLEUKIN()4()RECEPTOR, HAEMOPOIETIN()RECEPTOR
SEQUENCE SEARCH STN: WSDWS/SQSP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | "GUIDEBOOK TO CYTOKINES AND THEIR RECEPTORS" EDITED BY NICOLA NA (1994) OXFORD UNIVERSITY PRESS, OXFORD -pp 4,5,8,9: 31-35; 40-43; 47-49; 52-55; 59-61; 64-66; 82-83; 130-133; 137-139; 155-157; 161-163; 174-176; 191-193 | 1,3,4,10,25 |
| X | VITA N ET AL. "CHARACTERIZATION AND COMPARISON OF THE INTERLEUKIN 13 RECEPTOR WITH THE INTERLEUKIN 4 RECEPTOR ON SEVERAL CELL TYPES" J. BIOL. CHEM. VOL. 270(8) pp 3512-3517, 1995 (SEE ENTIRE DOCUMENT, IN PARTICULAR PAGE 3516, COLUMN 2; PAGE 2517, COLUMN 1) | 33,34,35 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C See patent family annex

| | | |
|---|-----|--|
| • Special categories of cited documents: | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "&" | document member of the same patent family |

Date of the actual completion of the international search

3 December 1996

Date of mailing of the international search report

3 JAN 1997

Name and mailing address of the ISA/AU
AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION
PO BOX 200
WODEN ACT 2606
AUSTRALIA Facsimile No.: (06) 285 3929

Authorized officer



KAREN AYERS

Telephone No.: (06) 283 2082

| C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|--------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages <i>(Remove spaces when completed if the page is too long)</i> | Relevant to claim No. |
| X | HARADA N ET AL. "EXPRESSION CLONING OF A cDNA ENCODING THE MURINE INTERLEUKIN 4 RECEPTOR BASED ON LIGAND BINDING" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA VOL. 87 pp 857-861, 1990 SEE ENTIRE DOCUMENT | 1,3,4,10,25 |
| P,X | CAPUT D ET AL. "CLONING AND CHARACTERISATION OF A SPECIFIC INTERLEUKIN (IL) -13 BINDING PROTEIN STRUCTURALLY RELATED TO THE IL-5 RECEPTOR ALPHA CHAIN" J. BIOL. CHEM. VOL. 271(28) pp 16921-16926 SEE ENTIRE DOCUMENT | 1,3,4,10,25 |
| P,X | WO 96/11213 (AMGEN BOULDER INC.) 18 April 1996. C07K 14/715, A61K 38/20, G01N 33/68. | 1,10,25,31,32 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/AU 96/00668

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in Search Report | Patent Family Member |
|--|----------------------|
| WO 96/11213 | AU 38308/95 |

END OF ANNEX

**INTERNATIONAL COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION**

(PCT Article 36 and Rule 70)

REC'D 08 AUG 1997
REPORT
WIPO
PCT

| | | |
|--|--|----------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference PN 6/35 EJH/EK | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416). | |
| International application No. PCT/AU 96/00668 | International filing date 23 October 1996 | Priority Date 23 October 1995 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int. Cl. 6 C12N 15/12, 5/06; C07K 14/115, 16/28, 19/00; A61K 38/16, 48/00; G01N 33/566, 33/53 | | |
| Applicant (1) AMRAD OPERATIONS PTY LTD (2) WILLSON T ET AL | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|----|-----------------------------------|-----|---|----|--|---|---|----|---|-----|---|------|--|
| 1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 0 sheet(s). | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. This report contains indications relating to the following items: <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">I</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td><input type="checkbox"/> Priority</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td><input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>VII</td> <td><input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>VIII</td> <td><input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</td> </tr> </table> | | I | <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report | II | <input type="checkbox"/> Priority | III | <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability | IV | <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention | V | <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement | VI | <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited | VII | <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application | VIII | <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application |
| I | <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report | | | | | | | | | | | | | | | | |
| II | <input type="checkbox"/> Priority | | | | | | | | | | | | | | | | |
| III | <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IV | <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention | | | | | | | | | | | | | | | | |
| V | <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement | | | | | | | | | | | | | | | | |
| VI | <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited | | | | | | | | | | | | | | | | |
| VII | <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application | | | | | | | | | | | | | | | | |
| VIII | <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 16 April 1997 | Date of completion of the report 30 July 1997 |
| Name and mailing address of the IPEA/AU AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No. (06) 285 3929 | Authorized Officer KAREN AYERS Telephone No. (06) 283 2082 |

L Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

the international application as originally filed.

the description, pages , as originally filed,
pages , filed with the demand,
pages , filed with the letter of
pages , filed with the letter of

the claims, Nos. , as originally filed,
Nos. , as amended under Article 19,
Nos. , filed with the demand,
Nos. , filed with the letter of ,
Nos. , filed with the letter of .

the drawings, sheets/fig , as originally filed,
sheets/fig , filed with the demand,
sheets/fig , filed with the letter of ,
sheets/fig , filed with the letter of .

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages

the claims, Nos.

the drawings, sheets/fig

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:
 - restricted the claims.
 - paid additional fees.
 - paid additional fees under protest.
 - neither restricted nor paid additional fees.
2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:
 - complied with.
 - not complied with for the following reasons:
4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:
 - all parts.
 - the parts relating to claims Nos.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | |
|-------------------------------|---|-----------|
| Novelty (N) | Claims 2, 5-9,11-24,26-32 Claims 1,3,4,10,25,33-35 | YES NO |
| Inventive step (IS) | Claims 2,5-9,11-24,26-32 Claims 1,3,4,10,25,33-35 | YES NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims 1-35 Claims | YES NO |

2. Citations and explanations

Citations

D1: "Guidebook To Cytokines and Their Receptors" edited by Nicola NA (1994) Oxford University Press

D2: J. Biol. Chem. (1995) vol. 270(8) pages 3512-3517 by Vita N et al. "Characterisation and comparison of the Interleukin-13 receptor with the Interleukin-14 receptor on several cell types"

D3: Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) vol. 87 pages 857-861 by Harada N et al. "Expression cloning of a cDNA encoding the murine interleukin-4 receptor based on ligand binding"

D1 is a text book which characterises a range of cytokines and their receptors. As claim 1 (and dependent claims 3, 4, 10 and 25) encompass any haemopoietin receptor sequence, these claims are deprived of their novelty and inventive step. Specific examples from D1 include the disclosure of the sequence of IL-3 and IL-7 receptors, the erythropoietin receptor, and the G-CSF receptor.

D2 discloses the characterisation of the IL-3 receptor and a comparison with IL-4 receptor and different cell types. The comparison between the two receptor types involves a number of binding assays to determine the degree of competitive inhibition, ie displacement and saturation and cross-linking experiments. Subsequently claims 33, 34 and 35 are not novel, and do not possess an inventive step.

D3 describes the isolation of DNA from murine IL-4 receptor. As claim 1, and corresponding dependent claims 3, 4, 10 and 25 are not restricted to any particular sequences, and encompass any haemopoietin receptor, they lack novelty and are not inventive.

None of the documents disclose sequence which correspond to SEQ. ID. NOS: 1, 2, 3 or 4 or a sequence that is capable of interaction with IL-3 and with the IL-4/IL-4 receptor α chain complex, meaning that claims 2, 5-9, 11-24 and 26-32 are novel and inventive.

Note that there are also documents cited in the International Search Report which were published later than the priority date claimed but prior to the international filing date. These may need to be considered during national phase examination.

All claims have industrial application in the area of medical research and the treatment of disease.

VI. Certain documents cited**1. Certain published documents (Rule 70.10)**

| Application No. Patent No. | Publication date (day/month/year) | Filing date (day/month/year) | Priority date (valid claim) (day/month/year) |
|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--|
|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--|

| | | | |
|-------------|---------------|----------------|----------------|
| WO 96/11213 | 18 April 1996 | 5 October 1995 | 7 October 1994 |
|-------------|---------------|----------------|----------------|

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure
(day/month/year)Date of written disclosure referring to
non-written disclosure
(day/month/year)

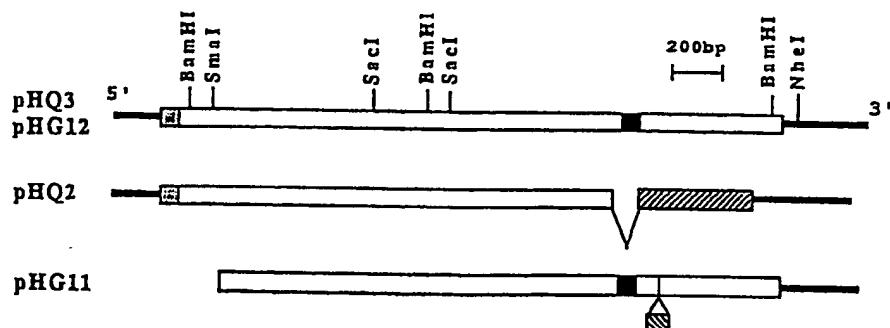


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | | |
|---|--|--|---|
| (51) 国際特許分類 5 C12N 15/12, 5/10, C12P 21/02 C07K 13/00 // (C12P 21/02 C12R 1/91) | | A1 | (11) 国際公開番号 WO 91/14776 |
| | | | (43) 国際公開日 1991年10月3日 (03. 10. 1991) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP91/00375 (22) 国際出願日 1991年3月22日 (22. 03. 91) (30) 優先権データ 特願平2/74539 1990年3月23日 (23. 03. 90) JP 特願平2/176629 1990年7月3日 (03. 07. 90) JP | | (81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BB, BE (欧州特許), BF (OAPI特許), BG, BJ (OAPI特許), BR, CA, CF (OAPI特許), CG (OAPI特許), CH (欧州特許), CM (OAPI特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FI, FR (欧州特許), GA (OAPI特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), HU, IT (欧州特許), JP, KR, LK, LU (欧州特許), MO, MG, ML (OAPI特許), MR (OAPI特許), MW, NL (欧州特許), NO, PL, RO, SD, SE (欧州特許), SN (OAPI特許), SU, TD (OAPI特許), TG (OAPI特許), US. | |
| (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE) [JP/JP] 〒565 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号 Osaka, (JP) | | (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 長田重一 (NAGATA, Shigekazu) [JP/JP] 〒565 大阪府吹田市佐井寺2-21-17-511 Osaka, (JP) 福永理己郎 (FUKUNAGA, Rikiro) [JP/JP] 〒562 大阪府箕面市小野原東5-5 フォルク北千里L-302 Osaka, (JP) | |
| (74) 代理人 弁理士 青山 保, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号 ウイン21 MIDタワー内 Osaka, (JP) | | (添付公開書類) 国際調査報告書 | |

(54) Title :DNA CODING FOR GRANULOCYTIC COLONY STIMULATING FACTOR RECEPTOR

(54) 発明の名称 顆粒球コロニー刺激因子レセプターをコードするDNA



(57) Abstract

A cDNA of a mouse G-CSF receptor is cloned from a library of cDNAs originating in mouse myeloid leukemia cells to analyze its structure. Further, by using this cDNA as the probe, a cDNA of a human G-CSF receptor is cloned from a library of cDNAs originating in human placental or human histiocytic lymphoma cells to analyze its structure and at the same time introduce it into a host cell to effect expression. As a result of this expression, it now becomes possible to stably supply a G-CSF receptor useful in both basic research and clinical application.

ることができる。

本発明のG-CSFレセプターをコードするDNAを含有する発

現ベクターは種々の方法で構築することができるので、当業者は適

宜選択すればよい。G-CSFレセプター遺伝子の発現に適したベ

クターは、G-CSFレセプターDNA配列の挿入部位の直ぐ上流

に転写開始のためのプロモーターを有するものが好ましい。適当な

プロモーターも当該技術分野で既知であり、宿主細胞内での機能特

性に応じて選択することができる。例えば、マウスマタロチオナイ

ンプロモーターおよびSV-40スモールTプロモーターを、それ

ぞれ、ネズミおよびサル細胞に用いることができる。細菌プロモー

ターを、細菌内でG-CSFを発現させるのに用いることもできる。

G-CSFレセプター配列の挿入部位下流にpoly-Aシグナルがあ

ることが望ましい。ベクター中には薬物耐性マーカーのような選択

可能マーカーが存在することが望ましい。特に望ましいマーカーと

してネオマイシン耐性遺伝子を挙げることができる。

発現ベクターはG-CSFレセプターをコードするDNAを適當

なベクターに挿入することにより構築することができる。適当なベ

クターは、プロモーター、polyAシグナル、選択マーカーその他の

条件を考慮し、当該技術分野で既知のものから選択する。本発明の

cDNAを挿入し、培養細胞に導入してこのcDNAを発現する目的

に用いることができるDNAベクターとして、例えばpSV2、ウ

シパピローマウィルスDNAを挙げることができる。

本発明のG-CSFレセプターの発現に用い得る培養細胞は複製

可能で第1図もしくは第8図記載のDNAを発現し得るものであれ

ばよい。例えば、大腸菌のような原核性微生物、S.セレビシエの

ような真核性微生物、さらには哺乳類細胞が用いられる。組織培養

細胞にはトリ、または哺乳類細胞、例えばネズミ、ラットおよびサ

ル細胞が含まれる。適当な宿主細胞-ベクターシステムの選択およ

び使用方法等は、当業者に既知であり、それらの内から本発明のG

-CSFレセプターをコードするcDNAの発現に適した系を任意

に選択することができる。

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明するが、これら

の実施例は本発明を制限するものではない。

実施例

実施例1 ネズミG-CSFレセプターDNAのクローニング

1) 細胞

ネズミ骨髓性白血病細胞NFS-60 (ワインシュタインら、 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83、 5010-5014 (198

6); セント・ジュード・チャイルドレンズ・リサーチ・ホスピタ

ルのJ. Ihle氏から寄贈) を、 10%ウシ胎児血清 (FCS) およ

び10~20単位/mlの組換えマウスIL-3を加えた RPMI 1

640培地で培養した。

COS-7細胞は常法通り10%FCS含有ダルベッコの改良イ
ーグル培地 (DMEM) で維持した。

2) 組換えG-CSFなどの増殖、分化因子

ヒトG-CSFcDNA (ツチヤら、1987、前掲) を担持す
るウシパピローマウイルス発現ベクター (フクナガら、 Proc. Nat
l. Acad. Sci. U.S.A. 81、 5086-5090 (1984)) で形

質転換したマウス C 1 2 7 I 細胞の培養液より、ヒト組換え G - C S F を精製した。

マウス G - C S F を、同様の発現システムを用い、均一タンパク質として精製した。チャイニーズハムスターの卵巣細胞によって産生されたヒト組換え G - C S F および M - C S F は中外製薬（日本）から得た。

E. coli によって産生されるヒト組換え G - C S F はアマーシャム (Amersham) から購入した。

マウス組換え I L - 3 および G M - C S F はミヤジマおよびアライ氏 (DNA X インスティチュート) から得た。

マウス組換え I L - 6 およびマウス組換え L I F は、それぞれ、ヒラノ氏 (大阪大学) およびニコラ氏 (ウォルター・エリザ・ホール・インスティチュート) から得た。

ラットプロラクチンはケミコンインターナショナル、インコーポレーテッドから購入した。

放射性ヨウ素でラベルしたネズミ組換え G - C S F は、改良 I O

D O - G E N 法 (フレイカーおよびスペック、 Biochem. Biophys.

Res. Commun. 80、 849-857 (1978)) により作成した

[比活性: $6 - 8 \times 10^4$ cpm/ngタンパク質 (1,200~1,60

0 cpm/fmole)] 。

3) CDM8 cDNAライブラリー

対数増殖期の NFS-60 細胞からグアニジンイソチオシアネー

ト/CsCl 法で全RNAを調製し、オリゴ(dT)-セルロース

カラムクロマトグラフィーで poly(A) RNA を選択した。逆転写

酵素 (生化学工業から購入) とアマーシャム社のキットを用い、文

献記載 (ナガタら、 Nature 319、 415-418 (1986)) に

従って 2 本鎖 cDNA を合成した。

得られた平滑末端 cDNA に BstXI アダプターを付加し、 1%

アガロースゲルで電気泳動した。 1.8 kb 以上の cDNA をゲルか

ら回収し、 BstXI - 消化 哺乳類発現ベクター CDM8 (シード、

1987、 前掲) に結合 (ライゲーション) させ、 得られた DNA

で E. coli MC1061/p3 細胞を形質転換した (電気穿孔法、

ダウエルら、Nucleic Acids Res. 16、6127-6145(1988)。

4) DNAの調製

6×10^4 個の細菌コロニーを24ウェルのマイクロタイプレートに、ウェルあたり60~80コロニーの密度でプレートした。

コロニーの各プールごとにグリセリン培養を調製した。各グリセリ

ン培養の一部をLBプロスに接種し、煮沸法(ボイリング法)で各

プールからプラスミドDNAを調製し(マニアティスら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 1982)、フェノール抽出

出およびエタノール沈殿に付した。

5) COS-7細胞のトランスフェクション

6ウェルのマイクロタイプレートでCOS-7細胞の単層培養を得、この細胞を改良DEAEデキストラン法(ソンパイラック

およびダンナ、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 7、575-7578(1981)により上記4)で調製したプラスミドDNA

を用いてトランスフェクションした。

即ち、約50%の全面成長した細胞を血清不含DMEMで3回洗浄し、37°Cで8時間、50mM Tris-HCl(pH 7.3)、0.3mg/ml DEAE-デキストランおよびプラスミドDNA 1 μgを含有するDMEM 0.6ml中でインキュベートした。20%グリセリン含有Tris-HCl緩衝化食塩水を用い、室温で2分間グリセリンショックに付した後、細胞をDMEMで2回洗浄し、10%FCS含有DMEM中でインキュベートした。

6) G-CSF レセプターを発現しているCOS-7細胞（形質転換体）のスクリーニング

トランスフェクションから72時間後、COS-7細胞を、10%FCSおよび20mM HEPES含有DMEM (pH 7.3)（結合培地）で洗浄し、結合培地0.6ml中の¹²⁵I-G-CSF (1.7 × 10⁵cpm(200 pM))と共に37°Cで2時間インキュベートした。結合しなかった放射活性G-CSFを除去し、細胞を0.7mM CaCl₂と0.5mM MgCl₂を補充したりん酸緩衝化食塩水 (PBS) で3回、PBSで1回洗浄した。次いで、細胞をトリプシン

処理して回収し、細胞と結合した放射活性を AUTO-GAMMA

5000 MINAXI ガンマカウンター(Packard)で計数した。

125 I でラベルした G-CSF と CDM8 ベクターでトランスフェ

クトされた COS 細胞とのバックグラウンド結合は 308 ± 38 (S

D) cpm であった。一方、cDNA を含むプラスミド DNA のプール

で形質転換した COS 細胞のうち、2 つのプール(I 62 と J 17)

のプラスミド DNA を導入した COS 細胞が 125 I - G-CSF と

有意な結合を示した (それぞれ 500 cpm、912 cpm)。

各陽性プール(I 62 と J 17)から得た 144 の独立のクローン

を 24 ウエルのマイクロタイタープレート(6 プレート)で培養し、

12×12 クローンを用いて sib 選択に付した (マニアティスら、前

述、1982)。プラスミドのミニプレパレーション、および CO

S-7 細胞のトランスフェクションの後、 125 I - G-CSF との

結合反応を行い、各陽性プールから単一のクローンを選択した。

すなわち、プール I 62 および J 17 の細菌クローンを各 12 ク

ローンの 12 サブグループに分けた。幾つかのサブグループは CO

S細胞への¹²⁵I-G-CSFの結合反応が3710および4010cpmであった。そして各陽性サブグループの単一のクローンを分離して2個の独立のクローンpI62およびpJ17を同定した。pI62およびpJ17のプラスミドDNAでCOS-7細胞をトランسفェクトしたときの¹²⁵I-G-CSF結合値はそれぞれ30300cpmおよび31600cpmであった。次いで、プラスミドpJ17およびpI62の塩基配列を決定したところ、これらはいずれもG-CSFレセプターの完全なコーディング領域を含有しているが、poly(A)配列もpoly(A)付加シグナルも含有していないことが分かった。そこで、pJ17の2.5kb HindIII-XbaIをプローブとするコロニーハイブリザイゼーションによって、上記cDNAライブラリーを再度スクリーニングし、陽性クローンの1つ(pF1)を選択した。これは603bpの3'非コーディング領域を含み、その領域には、2個の重複するpoly(A)付加シグナルが存在していた。これら3個のクローン化cDNA(pI62、pJ17およびpF1)の塩基配列およびそれより類推されるアミノ酸配列を第1図に

(57) 要約

マウス骨髓性白血病細胞由来のcDNAライブラリーから、マウスG-CSFレセプターのcDNAをクローニングし、その構造を解析した。更に、該cDNAをプローブとして、ヒト胎盤またはヒト組織球リンパ腫細胞由来のcDNAライブラリーから、ヒトG-CSFレセプターのcDNAをクローニングし、その構造を解析すると共に、それを宿主細胞に導入して発現させた。

クローニングされた、G-CSFレセプターのcDNAを宿主細胞に導入し発現させることによって、基礎研究、臨床応用共に有用なG-CSFレセプターの安定的な供給が可能となった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | |
|----|-----------|----|-------------|----|--------|
| AT | オーストリア | ES | スペイン | ML | マリ |
| AU | オーストラリア | FI | フィンランド | MN | モンゴル |
| BB | バルバードス | FR | フランス | MR | モーリタニア |
| BE | ベルギー | GA | ガボン | MW | マラウイ |
| BF | ブルキナ・ファソ | GI | ギニア | NL | オランダ |
| BG | ブルガリア | GB | イギリス | NO | ノルウェー |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | PL | ポーランド |
| BR | ブラジル | HU | ハンガリー | RO | ルーマニア |
| CA | カナダ | IT | イタリー | SD | スー丹 |
| CF | 中央アフリカ共和国 | JP | 日本 | SE | スウェーデン |
| CG | コンゴー | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | SN | セネガル |
| CH | スイス | KR | 大韓民国 | SU | ソビエト連邦 |
| CI | コート・ジボアール | LI | リヒテンシュタイン | TD | チャード |
| CM | カメルーン | LK | スリランカ | TG | トーゴ |
| CS | チェコスロバキア | LU | ルクセンブルグ | US | 米国 |
| DE | ドイツ | MC | モナコ | | |
| DK | デンマーク | MG | マダガスカル | | |

明細書

顆粒球コロニー刺激因子レセプターをコードするDNA

技術分野

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子レセプターをコードするDNAに関する、さらに詳しくは、顆粒球コロニー刺激因子(以下、G-CSFと称する)と特異的に結合し得るレセプターペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する発現ベクター、該ベクターを含有する形質転換体、並びに該形質転換体を培養することにより、該レセプターを製造する方法に関するものである。さらにまた本発明は、このようにして製造された組換えG-CSFレセプターに関するものである。

背景技術

血液細胞の増殖と分化はコロニー刺激因子(CSF)と称するホルモン様の増殖および分化因子によって制御されている[メトカルフ(M

etcalf, D.)、ネイチャー(Nature)、339、27~30(1989)。CSFは、その作用する状況または段階に応じて顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージのコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージのコロニー刺激因子(M-CSF)およびインターロイキン3(IL-3)に大別される。それらの内、G-CSFは好中性顆粒球の増殖および分化に重要な役割を担っており、血液中の好中球濃度の制御、並びに成熟好中球の賦活化に深く関与していることが分かっている[ナガタ(Nagata, S.)、ハンドブック・オブ・エクスペリメンタル・ファルマコロジー(Handbook of Experimental Pharmacology)、「ペプチド・グロウス・ファクター・アンド・デア・レセプターズ(Peptide Growth Factors and Their Receptors)」、スローン(Sporen, M. B.)およびロバーツ(Roberts, A. B.)編、スプリングラー・バーラグ、ハイデルベルク(Springer-Verlag, Heidelberg)、Vol. 95/I、699~722頁(1990);ニコラ(Nicola, N. A.)、Annu. Rev. Biochem.、58、45~77(1989)]。即ち、G-CSFは好

中球の前駆細胞に存在するレセプター(G-CSFレセプター)を介

して該細胞に作用し、その増殖、あるいは分化を刺激して主に好中

性顆粒球を与える[ニコラ(Nicola, N. A.)およびメトカルフ(Met

calf, D.)、プロシードィングズ・オブ・ナショナル・アカデミ

ー・オブ・サイエンシーズ(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、

81、3765~3769(1984)]。

G-CSFにはその他、様々な作用があり、例えば、組換えDN

A技術で得られたG-CSFを用いたインビボの動物実験により、

該G-CSFが好中球の調節因子であることが示唆された(ツチャ

ら、EMBO J. 6、611~616(1987);ニコラら、An

nu. Rev. Biochem. 58、45~77(1989))。また、がん患

者へのG-CSF投与が化学療法および骨髄移植療法に有利である

ことを示す臨床報告もある(モースチンら、Trends Pharmacol. S

ci. 10、154~159(1989))。その一方で骨髄性白血病

細胞などのがん細胞の増殖がG-CSFによって刺激される場合の

あることも知られている。

このように、G-CSFは臨床上極めて重要な生理活性物質であるにもかかわらず、作用機構には不明な点が残されており、より有効な治療および診断を達成する上で、作用機構の解明が待たれている。そのためには細胞表面に存在するヒトG-CSFレセプターを生化学的に特性化し、該レセプターとG-CSFとの相互作用を研究する必要がある。

ところで、G-CSFの作用する細胞は好中球の前駆体および成熟した好中球、および種々の骨髓性白血病細胞に限定されている（ニコラおよびメトカーフ、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81、3765-3769(1984)、ベグレーら、Leukemia 1、1-8(1987)、パークら、Blood 74、56-65(1989)）。ヒトG-CSFは174アミノ酸、ネズミG-CSFは178アミノ酸からなるポリペプチドであり、ヒトG-CSFとネズミG-CSFの相同性はアミノ酸配列レベルで72.6%と高く、種特異性は殆んど認められないことも明らかである（ニコラら、Nature 314、625-628(1985)）。他方、G-CSFレセプターは

非血液細胞、例えばヒト内皮細胞（ブッソリノら、Nature 337、
471-473(1989)）および胎盤（ウズマキら、Proc. Nat
l. Acad. Sci. U S A 86、9323-9326(1989)）にも
存在していることが最近、報告され、G-CSFの作用は一層興味
深いものがある。

以上のように、G-CSFとG-CSFレセプターとの相互作用
の解明は学問的な見地からも価値があるが、臨床面においても、造
血性疾患または他の疾患の予防および治療におけるG-CSFの投
与方法の確立、ひいてはより正確で有効な処置を達成するために重
要である。他方、レセプター自身の用途として、可溶化型G-CS
Fレセプターが、ある種のG-CSF依存性ヒト白血病細胞（サン
トリら、J. Immunol. 139、3348-3354(1987)）の
増殖阻害に臨床上有用である可能性も存在する。さらに、骨髓性白
血病細胞などのがん細胞がG-CSFにより増殖する可能性もあり、
該細胞におけるG-CSFレセプターの発現を検討し、G-CSF
の臨床応用をより有効に行うことができる。このように、研究およ

び実用化の両面でG-CSFレセプターには様々な有用性が指摘されており、G-CSFレセプター遺伝子およびそのタンパク質の安定的な供給が望まれる。

近年、多くの生理活性物質の製造に遺伝子工学の技術が利用されている。遺伝子工学による物質生産においては、通常、目的とするポリペプチドをコードするDNAのクローニングを行い、該DNAを適当な発現ベクターに組み込み、得られた組換えDNAを用いて微生物や動物細胞等を形質転換し、目的物質を発現させる。

G-CSFレセプターを遺伝子工学の技術により生産するには、まず目的物質であるG-CSFレセプターをコードするDNAのクローニングを行う必要があるが、G-CSFレセプターは細胞表面における存在が極めて少数(細胞あたり、数百~200個)であるためにそのcDNAのクローニングが容易でなかった。

発明の開示

本発明者らは、ヒトG-CSFとネズミG-CSFとのアミノ酸レベルでの相同性が72.6%と高く、種特異性は殆んど認められ

ないことから、それぞれのG-CSFとG-CSFレセプターとの間に交差反応が予測される、ということに着目し、まず、研究ならばに診断分析に適用し得るG-CSFレセプターを得ることを目的として、ネズミ（マウス）骨髓性白血病 NFS-60細胞から、そのレセプターを可溶化し、分子量100,000から130,000のタンパク質として精製した。精製方法としては、例えば、細胞膜懸濁液をCHAPS{3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸}で抽出した後、その抽出液をG-CSFアフィニティークロマト（組換えヒトG-CSFをゲル樹脂に結合したアフィニティークロマト）で処理し、次いでゲル滌過で精製することができる。

一方、NFS-60細胞から得たmRNAを逆転写し、ネズミのG-CSFレセプターをコードするcDNA（以下、G-CSFレセプターcDNAという）を単離、クローニングすることに初めて成功した。次いで、このcDNAの塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。ネズミG-CSFレセプター-cDNAの塩基配列お

および推定のアミノ酸配列を第1図に示す。

ネズミG-CSFレセプターcDNAを含有する発現クローニング

ベクターでCOS細胞を形質転換すると、該細胞は NFS-60

細胞上に存在する天然のネズミG-CSFレセプターと同様の性質

を有するレセプターを発現した。ネズミG-CSFレセプターcD

NAの塩基配列に基づいてG-CSFレセプターのアミノ酸配列を

類推し、他の増殖因子レセプターファミリーのそれと比較した結果、

このネズミG-CSFレセプターは、それらと共に共通する特徴を有す

ることが明らかになった（第7図参照）。また、このようにして得

たネズミG-CSFレセプターをコードするDNAから調製したプローブは、ヒトG-CSFレセプターとハイブリダイズした。これ

はG-CSFレセプターには種特異性がなく、ヒトG-CSFレセ

プターはマウスG-CSFレセプターと非常に相似していることを

示すものであり、従ってネズミG-CSFレセプターDNAは、ヒ

トG-CSFレセプターを製造する為のいわば中間体として極めて

有用である。

次に本発明者らはヒトG-CSFレセプターを十分な量、供給することを目的として、ネズミG-CSFレセプターをコードするDNAから調製したプローブを用い、ヒト胎盤およびU937細胞由来の全(total)RNAから作成したcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトG-CSFレセプターをコードするcDNAをクローニングすることに成功した。

本発明のヒトG-CSFレセプターをコードするプラスミドで形質転換されたサルCOS細胞は天然のヒトG-CSFレセプターと同様のG-CSFとの特異的な結合特性を有するヒトG-CSFレセプターを産生した。

即ち、本発明はG-CSFレセプターをコードするDNAを提供するものである。また本発明はG-CSFレセプターをコードしている発現ベクターを提供するものもある。さらに本発明は、該発現ベクターで培養細胞を形質転換し、形質転換体を培地に培養し、培養物からG-CSFレセプターを回収することからなるG-CSFレセプターの製造方法を提供するものである。

なお、本明細書中、G-CSFレセプターペプチドなる語句は、

成熟G-CSFレセプターのみならず、該レセプター分子の一部で

あって、G-CSFとの特異的結合活性を有するペプチド分子の全

てを指すものとする。

本発明により、従来、単離が困難であったヒトG-CSFレセプ

ターを遺伝子組換え法により容易に得ることが可能となったので、

そのようにして得られた組換えG-CSFレセプターを用いてG-

CSF、およびG-CSFレセプターの作用機構および臨床(診断

および治療)適用のための研究、並びに実用化を推進することがで

きる。また、G-CSFを白血病などの癌患者に臨床応用する際に、

当該癌細胞がG-CSFレセプターを発現しているか否かを、G-

CSFレセプターcDNAをプローブとして用いて容易に検討する

ことができる。従って、そのようなcDNAはG-CSFの有効な

臨床応用に役立つと考えられる。さらに、可溶化型G-CSFを遺

伝子組換え法により大量に生産し、その三次構造を解析する、等に

より、G-CSFレセプターに、効率よく結合するタンパク質や化

合物を開発することも可能である。

ネズミ G-CSF レセプターをコードする DNA のクローニングは、次記の方法により行われた。即ち、G-CSF レセプターの発現率が高いマウス骨髓性白血病細胞 NFS-60 から G-CSF レセプターを精製し、その分子量が 100,000-130,000 ダルトンであることを確認した。さらに、該細胞から、グアニジンチオイソシアネート / CsCl 法で全 RNA を調製し、poly(A)RNA を選択した。次いで、逆転写酵素、DNA ポリメラーゼなどを用いて 2 本鎖 cDNA を合成し、哺乳類発現ベクター CDM8 (シード、Nature 329、840-842 (1987)) をベクターとする cDNA ライブラリーを構築した (60-80 クローンの 884 プール)。各プールからプラスミド DNA を調製して COS-7 細胞に導入し、放射性ヨウ素でラベルした G-CSF を用いて結合活性を示す 2 つのプール I 62 および J 17 を選択した。これらのプールから、G-CSF との結合活性が高い 2 個の独立のクローン、プラスミド pI 62 および pJ 17 を同定した。これらのプラスミドで

形質転換されたCOS細胞は、G-CSFと結合活性を有するレセ

プターを発現した。

次いで、プラスミドpJ17およびpI62の塩基配列を決定し

た結果、これらはいずれもネズミG-CSFレセプターの完全なコ

ーディング領域を含有しているが、poly(A)配列もpoly(A)付

加シグナルも含有していないことが分かった。そこで、pJ17の

2.5kb HindIII-XbaIをプローブとするコロニーハイブリザイ

ゼーションによって、上記cDNAライブラリーを再度スクリーニ

ングし、陽性クローンの1つ(pF1)を選択した。これは603

bpの3'非コーディング領域と、2個の重複するpoly(A)付加シ

グナルを含有していた。これら3個のクローン化cDNA(pI6

2、pJ17およびpF1)の塩基配列およびそれより類推される

アミノ酸配列を第1図に示す。また、その模式図および制限酵素切

断点地図、並びにハイドロパシープロットを第2図に示す。

本発明によりクローニングされたネズミG-CSFレセプターc

DNAは以下の特徴を有する。

ヌクレオチド 180-182 の開始コドン A T G とヌクレオチド 2691-2693 の終止コドン T A G との間に長いオープン・リーディング・フレーム (2,511 ヌクレオチド) を有する。その 5' 上流側には 3 個の開始コドンとなり得るコドンが、73、105 および 126 位に存在しているが、いずれの下流にも短いオープン・リーディング・フレームしか存在しない。プラスミド p I 62 を HindIII 消化して cDNA からこれら A T G コドンを欠失させても COS 細胞内での組換え G-CSF レセプターの発現は増減しないということが分かった。

さらに、ロング・オープン・リーディング・フレームの N-末端配列には疎水性アミノ酸からなる配列が存在し、これはシグナル配列と思われる。そして、代表的なシグナルペプチド開裂部位の配列との比較により N-末端 25 アミノ酸がシグナル配列と類推された。

以上から、成熟ネズミ G-CSF レセプターは、812 アミノ酸から成り、理論分子量 90,814 であると結論された。この値は¹ ²⁵I ヨウ素放射 G-CSF との結合実験の値(実施例 2(2) 参照、

第5図) や精製ネズミG-CSFレセプターの分子量(95,000
- 125,000)と比較して5,000-35,000ダルトン少な
い。この差異はおそらくG-CSFレセプターの細胞外領域に認め
られる11コの推定N-グリコシル化部位(Asn-X-Thr/Ser)
の幾つかに糖鎖が結合していることによるものであろう(第1図)。

成熟G-CSFレセプターのアミノ酸配列のヒドロパシープロッ
ト(第2図、B)(カイトおよびドゥーライト、J. Mol. Biol. 15
7、105-132(1982))によると、Leu-602からCys
-625に至る24個のアミノ酸は非荷電アミノ酸であり、3個の
塩基性アミノ酸がこれに続く。これらの特徴は多くの膜タンパク質
における膜貫通領域に認められる特徴と一致している。

このように、成熟G-CSFレセプターは601アミノ酸の細胞
外ドメイン、24アミノ酸の膜貫通領域(单一のトランスメンブラ
ン領域)、および187アミノ酸の細胞質ドメインからなる。細胞
外ドメインのNH₂末端373コのアミノ酸はシステイン残基に富
んでおり(17/373アミノ酸)、これは多くのレセプターのリ

ガンド結合領域に共通する性質である（マクドナルトら、British Medical Bulltein 455、54-569(1989)）。エリスロポエチンレセプター（ドンドレらCell 57、277-285(1989)）と同様、G-CSFレセプターもプロリンに富み(80残基、9.9%)、また、ネズミG-CSFレセプターはトリプトファン残基をかなり高含有率で含有する(26残基、3.2%)。

以上から明らかな様に、本発明により決定されたネズミG-CSFレセプターは、増殖および分化因子のレセプターに共通する特徴である、N末端のシグナル配列、単一のトランスメンブラン領域、N末端部分における細胞外ドメイン、C末端部分における細胞内ドメインから成る。

さらに、ネズミG-CSFレセプターのアミノ酸配列と他の増殖因子のレセプターのアミノ酸配列とを比較して以下の結果を得た（第7図）。比較に用いたのは、成長ホルモン、プロラクチン、エリスロポエチン、IL-6、IL-2、IL-4、IL-3、GM-CSFのレセプターであって、これらはすべて増殖因子レセプター群

に属する。7 A図に示されているように増殖因子レセプター群で共通に見い出されるシステインとトリプトファン残基はG-CSFレセプターにおいても保存されており、“WSXWS”モチーフ(ギアリング、EMBO J. 83、667-3676(1989)、イトウら、Science 247、324-326(1990))もアミノ酸残基294-298に認められ、該G-CSFが同群に属することを示唆している。このG-CSFレセプターと他の血液細胞増殖因子レセプター群の比較により、G-CSFとIL-6の相同性は44.6%であるが、そのレセプター間の相同性はG-CSFレセプターとプロラクチンレセプターとの相同性に比較して低い。また、第7 B図に示されているようにG-CSFレセプターの細胞外領域のアミノ酸配列(376-601)とニワトリコンタクチン(ランシト、J. Cell. Biol. 107、1561-1573(1988))の細胞外領域の一部とに有意な相同性が認められる。コンタクチンは神経細胞表面糖タンパク質(130KD)であって神経系の細胞間情報伝達に関連しているとされている。コンタクチンのアミノ酸

残基 737-818 は細胞、ヘパリンおよびDNAとの結合に関連

するフィブロネクチンⅢ型セグメントと相同性を保持しており、こ

の領域は細胞同士の付着に重要な役割を担っていると思われる。骨

髄では常に顆粒球が形成されており、好中球の前駆細胞と骨髄質細

胞との直接相互作用の存在が示されている (ロバートら、Nature

332、376-378 (1988))。上記のネズミ G-CSF レ

セプターとコンタクチンの細胞外領域の類似性はこの領域が好中球

の前駆細胞と骨髄質細胞との相互作用に関与していることを示唆す

るものである。

G-CSF の細胞質ドメインは、他の増殖因子レセプターと同様、

セリン (12.8%) およびプロリン (12.3%) に富む。そして、

G-CSF レセプターのトランスメンブランおよび細胞質領域の配

列は IL-4 レセプターと有意に類似する。

第 7 (c) 図に示すように、G-CSF レセプターのトランスメン

ブラン領域および細胞質領域の最初の 46 アミノ酸はネズミ IL-

4 の対応する領域と相同である (50.0%)。さらに、G-CS

F レセプターのアミノ酸残基 672-808 は IL-4 レセプターのアミノ酸残基 557-694 と有意な類似性を持つ (45.4%) 。このことは、G-CSF による細胞への情報伝達と IL-4 による情報伝達が同様の機構で起こっていることを示唆するものである。

本発明においては、ネズミ白血病細胞 NFS-60 細胞から得た mRNA の逆転写により cDNA を得たが、この cDNA は同一動物の他の細胞（例えば、WEHI-3BD⁺ 細胞やマウス骨髄細胞）の mRNA からも得ることができる（第 6 図参照）。また、それは他の動物種（例えばヒト）のゲノムとも相同である。

G-CSF レセプターの 3.7 kb mRNA は NFS-60 細胞のみならず WEHI-3BD⁺ にも検出された（同図）。このことは G-CSF による NFS-60 細胞の増殖と WEHI-3BD⁺ 細胞の分化が同一 G-CSF レセプターに関連していることを示唆するものである。 NFS-60 および WEHI-3BD⁺ 細胞に対する G-CSF 作用が増殖と分化という異なる結果をもたらすのは、

レセプターより下流のシグナル伝達機構が異なることに起因すると
思われる。例えば、骨髄細胞の分化に関与すると思われるc-mybお
よびevi-1部位がNFS-60細胞内では再編成されているが、
WEHI-3BD⁺細胞内では再編成されていないという相違点が
報告されている（モリシタら、Cell 54、831-840（19
89））。

本発明のネズミG-CSFレセプターをコードするDNAは第1
図記載の塩基配列に従って得ることができる。これは、受託番号、
微研菌寄第11353号（FERM P-11353）の下で通
商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され（寄託日：平
成2年3月9日）、その後ブダペスト条約の下で国際寄託に移管さ
れたEscherichia coli. pI 62から常法通り単離することができ
る（国際寄託における受託番号：微研条寄第3312号（FER
M B P-3312；移管日：平成3年3月16日）。あるいは化
学合成することも可能であり、さらには該配列に基づいて、通常、
約30ヌクレオチドのプローブを合成し、これをゲノムライブラリ

ーまたはcDNAライブラリーのハイブリダイゼーションプローブとして用いることにより、得ることもできる。そのようなライブラリーは、上記のごとく、G-CSFレセプターを発現する任意の種、例えばヒト、マウス、ラット、その他の動物から調製することができる。プローブとして用いるDNAの合成およびハイブリダイゼーション法は当業者に既知である。ゲノムライブラリーおよびcDNAライブラリーの調製も当業者既知である。

また本発明のヒトG-CSFレセプターをコードするcDNAのクローニングは、次記の方法により行われた。即ち、G-CSFレセプターの発現率が高いヒト胎盤およびU937細胞(human histiocytic lymphoma, ATCC CRL 1593)から全RNAを調製し、poly(A)RNAを選択した。次いで、逆転写酵素、DNAポリメラーゼなどを用いて2本鎖cDNAを合成し、哺乳類発現ベクタ-pEF-BOS(第14図参照)を用いてcDNAライブラリーを構築した。一方、前述のネズミG-CSFをコードするDNAからハイブリダイゼーションプローブを調製し、該プローブを用いるコロ

ニーハイブリダイゼーションあるいはブラークハイブリダイゼーションによって上記cDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選択した。

U937細胞から調製したcDNAライブラリーから5個の陽性クローンが単離された(pHQ1～pHQ5)。他方、ヒト胎盤から調製

したcDNAライブラリーから100個以上の陽性クローンが得られ

れ、その内6個の陽性クローンを単離してEcoRI消化し、得られたEcoRI断片をpBluescript SK(+)でサブクローニングした。

次いで、単離したcDNAを制限酵素マッピングおよびDNA配列

決定により分析した。その結果、クローンは以下の3クラスに分類

されることが分かった。胎盤およびU937細胞から得られたcD

NAの大部分がクラス1に属していた。

クラス1：プラスミドpHQ3(U937細胞)およびpHG12(胎盤)

このクラスのクローンは836アミノ酸のタンパク質をコードす

る大きいオープン・リーディング・フレームを有する。その塩基配

列および推定のアミノ酸配列を第8図Aに示す。推定のアミノ酸配列のヒドロパシー分析により、このクラスのcDNAによってコードされているG-CSFレセプターは、N末端から23アミノ酸残基のシグナル配列、604残基の細胞外ドメイン、26残基からなる膜貫通領域(トランスメンプラン・ドメイン)、および183残基の細胞質ドメインを含有することが示された。プラスミドpHQ3(pHG12と同一)の制限酵素切断点は第9図に記載されている。

このプラスミドにコードされているヒトG-CSFレセプター(813アミノ酸)の推定の分子量は従来のヒトG-CSFレセプターの分子量と30,000~60,000ダルトン相違している。これは細胞外領域に存在する9個の潜在的N-グリコシル化部位がグリコシル化されることによるものと考えられる。

本発明によりクローニングされたヒトG-CSFレセプターとネズミG-CSFレセプターとの相同性はヌクレオチド配列レベルで72%、アミノ酸配列レベルで62.5%であり、アミノ酸配列における相同性は分子の全領域を通して均一であった。このヒトG-

C S F レセプターの細胞外ドメインには 17 個のシステイン残基があり、その 14 個はヒトおよびネズミで保存されている。さらに該細胞外ドメインには、サイトカインレセプターに共通する保存的な "W S X W S" モチーフも存在しており、ヒト G-C S F レセプターがサイトカインレセプター群に属することが示された。

クラス 2 : プラスミド pH Q 2 (U 937 細胞)

プラスミド pH Q 2 の塩基配列は、pH Q 3 の配列から、ヌクレオチド番号 2,034-2,121 の 88 ヌクレオチドが欠失していることを除いて pH Q 3 のそれと同一である。この 88 ヌクレオチド領域には膜貫通領域が含まれている。該プラスミドの欠失開始部位から下流のヌクレオチド配列を第 8 図 B に示す。

図から明らかに、pH Q 2 においては、欠失部位から下流の 150 アミノ酸をコードする翻訳リーディングフレームの配列が pH Q 3 の配列と異なっており、分泌、可溶化型の G-C S F レセプターをコードしていると考えられる。このレセプターは 748 アミノ酸からなり、分子量の計算値は 82,707 である。

クラス3：プラスミドpHG11およびpHG5(胎盤)

これらのプラスミドはpHQ3の配列において、ヌクレオチド番号2,210位に81bpの挿入を含有するものである。挿入位置はG-CSFレセプターの細胞質ドメインであり翻訳オープンリーディングフレームは変化していない。挿入部分のヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を第8図Cに示す。プラスミドpHQ2によってコードされているレセプターのアミノ酸数はクラス1のG-CSFレセプターよりも27個多く、分子量は2,957大きい。この挿入部を有するcDNAの制限地図を第9図に示す。

上記3種のヒトG-CSFレセプター-cDNAのG-CSFとの結合活性を調べたところ、クラス1のプラスミドpHQ3で形質転換されたサルCOS細胞はネズミ¹²⁵I-G-CSFと高い親和性を有していた(結合における解離定数は550pMであり、レセプター数は 3.4×10^4 個/細胞)。この結合における親和性は、COS細胞によって発現されたネズミG-CSFレセプターに対するネズミG-CSFの結合における親和性とほぼ同一であった。天然に

U 9 3 7 細胞表面に存在するレセプターに対するヒトG-CSFの

結合親和性は解離定数424pMである[パーク(Park, L. S.)、ワルドロン(Waldron, P. E.)、フレンド(Friend, D.)、サッセンフェルド(Sassenfeld, H. M.)、プライス(Price, V.)、アンダーソン(Anderson, D.)、コスマン(Cosman, D.)、アンドリュー(Andrews, R. G.)、バーンスタイン(Bernstein, I. D.)およびアーダル(Andral, D. L.)、ブラッド(Blood)、74、56～65(1989)]

ことから、pHQ3によってコードされているポリペプチドはG-CSFと十分に高い親和性を有するレセプターである。

他方、クラス2のpHQ2によりコードされたポリペプチドは一部を欠失していることから、pHQ2 cDNAで形質転換されたCOS細胞とネズミ¹²⁵I-G-CSFとの結合は極めて低レベルであった。解離定数は440pMであって結合部位は 6×10^3 ／細胞であった。このことからも膜貫通領域を欠くpHQ2によりコードされているレセプターは細胞から分泌された可溶化型であると考えられる。

クラス3のcDNAの結合特性を調べるために、pHQ3cDNAの5'側の配列とpHG11の3'側の配列とを哺乳類発現ベクターpEF-BOSに挿入して発現プラスミドpQW11を構築した。このプラスミドを用いてCOS細胞を形質転換し、得られた形質転換体とネズミ¹²⁵I-G-CSFとの結合分析を行った結果、細胞質ドメインにおける27アミノ酸挿入体は、G-CSFとの結合活性に殆んど影響していないことが分かった。

本発明のヒトG-CSFレセプターをコードするDNAの塩基配列は第8図に記載されている。このDNAは、受託番号、微研菌寄第11566号、第11567号および第11568号の下で通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され(寄託日:平成2年6月28日)、その後ブダペスト条約の下、平成3年3月16日付けで国際寄託に移管されたEscherichia coli. pHQ2、Escherichia coli. pHQ3およびEscherichia coli. pHG11から常法通り単離することができる。これらの国際寄託における受託番号および移管日は下記の通りである。Escherichia coli. pHQ

2 ; 受託番号 : 微研条寄第3313号 (FERM BP-3313) ; Escherichia coli. pHQ3 : 微研条寄第3314号 (FERM BP-3314) ; Escherichia coli. pHG11 : 微研条寄第3315号 (FERM BP-3315)。

本発明者らはまた、これらのヒトG-CSFレセプターcDNAから調製したプローブを用い、ノーザンハイブリダイゼーションにより、種々のヒト組織細胞をG-CSFレセプターRNAの存在に関する分析した。U937細胞、胎盤およびKG-1細胞が3.7kbの単一バンドを与え、中でも、胎盤がG-CSFレセプターのmRNAを大量に発現していることが確認された。

さらに、PCR法により、細胞により発現されるレセプターの種類を検討し、クラス1G-CSFレセプターは、U937および胎盤細胞の両者、クラス2の可溶化型レセプターはU937細胞、挿入体を有するクラス3レセプターは胎盤細胞により発現されることを確認した。

また、サザーンハイブリダイゼーションにより、G-CSFレセ

ブターをコードする遺伝子の数を検討した結果、ヒトハプロイドゲ

ノムあたり、単一の遺伝子が存在することを見いたした。

本発明により、ヒトG-CSFレセプターをコードするDNAの

ヌクレオチド配列が明らかになったので、このDNAを用いて適當

な宿主系で機能する発現ベクターを構築し、その発現ベクターで宿

主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、

組換えヒトG-CSFレセプターを製造することができる。このよ

うにして得られた組換えヒトG-CSFレセプターは、白血病の診

断やヒトG-CSFの作用機構の解明等、様々な目的に有用である。

本発明のG-CSFレセプターをコードするcDNAのヌクレオ

チド配列はマウスについては第1(a)図、第1(b)図、第1(c)図お

よびヒトについては第8(a)図、第8(b)図、第8(c)図に記載され

ているが、当業者ならば、これらのDNAから、ヌクレオチドの挿

入、置換または欠失により、容易に同様の活性を有する誘導体を導

くことができるということを理解するであろう。従って、そのよう

にして導かれるDNAも本発明の範囲に包含されるものである。

本発明の目的を達成するために用いるG-CSFと結合するポリペプチドは、必ずしも成熟G-CSFレセプターであることを必要としない。むしろ、G-CSFとの結合活性を有する断片であることが好ましい場合もある。同様に、成熟G-CSFレセプターをコードするDNAの全配列および、G-CSFをコードするDNAとの結合活性を有する、成熟G-CSFレセプターの一部をコードするDNA断片もまた有用である。

従って本発明は、G-CSFと結合し得るレセプターペプチド、並びに該ペプチドをコードするDNAを提供するものである。

このように、本発明のG-CSFレセプターペプチドをコードするDNAは、成熟G-CSFレセプター、並びに該成熟G-CSFレセプターのG-CSFとの結合活性を有するペプチド断片をコードするDNAを包含する。

本発明のDNAを用いて他の動物種のG-CSFレセプターをコードするDNAを得、G-CSFレセプターの発現ベクターを構築し、適当な培養細胞に導入して、G-CSFレセプターを発現させ

示す。また、その模式図および制限酵素切断点地図、並びにハイドロパシープロットを第2図に示す。

実施例2 クローニングしたネズミG-CSFレセプターDNAの特性化

1) クローン化G-CSFレセプターの結合活性

1125 I-G-CSFとCOS細胞およびNFS-60細胞との結合を調べた。

15cmのプレート上で培養したCOS細胞を、20 μ gのpI62またはpJ17でトランスフェクションした。グリセリンショック後、12時間後に6ウエルのマイクロタイプレートに分割して入れ、10%FCS含有DMEM中、60時間培養した。細胞を結合培地で洗浄し、種々の量の 125 I-G-CSF(10pM-1.2nMの範囲)と一緒に4°Cで4時間インキュベートした。 125 I-G-CSFと細胞の非特異結合を測定するために大過剰の非標識G-CSF(800nM)の存在下で結合反応を行い、全結合活性から非特異的に結合した放射活性を差し引くことにより特異的結合活性を求

めた。

一方、 5.2×10^6 個のNFS-60細胞を、種々の濃度の $^{125}\text{I}-\text{G-CSF}$ を含有する10%FCSと20mM HEPES(pH 7.3)からなるRPMI-1640培地0.3ml中で4°Cで4時間インキュベートすることにより、該細胞とG-CSFとを結合させた。第3図に結果を示す。Aは $^{125}\text{I}-\text{G-CSF}$ とCOS細胞との飽和結合を示す。上記のごとく、プラスミドpJ17で 1×10^6 COS細胞をトランスフェクションした後、種々の量の $^{125}\text{I}-\text{G-CSF}$ の存在下、過剰量の非標識G-CSFの存在下または非存在下でインキュベートした。○は全結合、△は非特異結合、●は特異結合を表し、特異結合は全結合と非特異結合の差として求めた値である。BはCOS細胞へのG-CSF結合データのスキャッチャードプロットを示すグラフである。Cは $^{125}\text{I}-\text{G-CSF}$ のNFS-60細胞への飽和結合を示すグラフであって、○は全結合、△は非特異結合、●は特異結合を表し、特異結合は全結合と非特異結合の差として求めた値である。DはNFS-60細胞へのG-CSF

F結合データのスキヤッチャードプロットを示すグラフである。該グラフから、COS細胞で発現されたG-CSFレセプターの平衡解離定数は290pMであって、細胞あたり 3.0×10^4 コのレセプターが存在することが分かる。COS細胞のトランスフェクション効率を10-20%とする(ソンパイラックおよびドナ、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 7575-7578(1981))と、トランスフェクション陽性のCOS細胞は組換えG-CSFレセプターを $1.5 \sim 3.0 \times 10^5$ コ/細胞の頻度で発現していると予測される。NFS-60細胞上の固有のG-CSFレセプターの平衡解離定数は180pM(第3D図)であるので、これらの結果はプラスミドpJ17にコードされているcDNAがネズミG-CSFに高い親和性を有するレセプターを発現するのに充分であることを示唆している。

次いで、COS細胞で発現された組換えG-CSFレセプターのG-CSFとの結合特異性を調べた。上記と同様にG-CSFレセプターのcDNA(pJ17)でトランスフェクションされたCO

S細胞を $1\mu g$ の非標識ネズミG-CSF、ヒトG-CSF、ネズミGM-CSF、ネズミIL-6、ネズミLIF、ラットプロラクチンまたはヒトM-CSFの存在下または非存在下で 2ng の ^{125}I -G-CSFと一緒にインキュベートした。ヒトG-CSFとしては、ネズミC127細胞、チャイニーズハムスターの卵巣細胞または大腸菌によって産生された組換えヒトG-CSFを用いた。各実験でCOS細胞と結合した ^{125}I -G-CSFの放射活性を競合物質不在の場合の値に対する%で表した。結果を第4図に示す。

ヒトG-CSFはネズミG-CSFとネズミWEHI-3B D⁺細胞との結合に競合する(ニコラら、1985、前掲)。哺乳類細胞または大腸菌のいずれかによって産生された非標識組換えヒトG-CSFは、標識したネズミG-CSFと、プラスミドpJ17でトランスフェクションされたCOS細胞の結合反応において充分競合した(第4図)。これに対し、非標識組換えネズミGM-CSF、ネズミIL-3、ネズミIL-6、ネズミ白血病阻害因子(LIF)、ラットプロラクチンまたはヒトM-CSFによっては ^{125}I -G-

C S F の C O S 細胞への結合は全く、阻害されなかった。

2) クロスリンキング反応

G - C S F 125 I - G - C S F と C O S 細胞によって発現された

レセプターとのクロスリンキング反応を以下のようにして行った。

上記のごとく、プラスミド p I 6 2 でトランスフェクションした

8×10^5 の C O S 細胞 (3.5 cm プレート) を 1.2 nM の 125 I -

G - C S F と一緒に、 $1.5 \mu\text{M}$ の非標識 G - C S F の存在または

非存在下、結合培地 0.6 ml 中、 4°C で 2.5 時間インキュベートし

た。セルリフターを用いてプレートから細胞をかきとり、P B S 1

ml で 3 回洗浄した。クロスリンキング反応は、 $150 \mu\text{M}$ スペリン

酸ジスクシンイミジル (D S S) および $150 \mu\text{M}$ 酒石酸ジスクシ

ンイミジル (D S T) を含有する P B S 1 ml 中で 20 分間、氷上で

行った。1 M Tris - HCl (pH 7.4) $50 \mu\text{l}$ を加えて反応を止

め、遠心して細胞を収集し、プロテアーゼインヒビター混合物 (2 mM

M E D T A、 2 mM (p - アミノフェニル) メタンスルホニルフルオ

リド塩酸塩、 2 mM O - フェナスロリン、 0.1 mM ロイペプチ

1 μ g/mlペプスタチンAおよび100単位/mlアプロチニン)を含有する1% Triton X-100 15 μ lで細胞を溶解した。遠心して上清を得、この透明なライゼート(10 μ l)を SDS の存在下4~20%ポリアクリルアミドゲルグラディエント電気泳動にかけて分析した(レムリ、Nature 227、680-685(1970))。強化スクリーンを用い、-80°Cで2日間X-線フィルムに感光した。サイズマーカーとして¹⁴Cラベル分子量標準(レインボウマーカー、アマーシャム)を並行して電気泳動させた。結果を第5図に示す。レーン2は過剰量の非標識ネズミG-CSFの存在下、レーン3および4は非存在下のクロスリンキング反応の結果を表す。ただし、レーン3ではDSSおよびDSTを含まない反応の結果である。レーン5はネズミNFS-60細胞(3×10^6 細胞/レーン)を同様に¹²⁵I-G-CSFと一緒に、過剰量の非標識G-CSFの存在下、レーン6は非存在下でインキュベートし、DSSおよびDSTによりクロスリンキングさせた実験の結果を表す。レーン1および7はそれぞれサイズマーカーとして用いた¹⁴Cラベ

ル分子量標準（レインボウマーカー、アマーシャム）である。タン

パク質標準の分子量をkdで示す。

N F S - 6 0 細胞上のG - C S F レセプターと標識化ネズミ G -

C S F (分子量 25,000) とのクロスリンキング反応で見掛け

の分子量 125,000 - 155,000 (レーン6) が得られ、こ

れは N F S - 6 0 上のネズミ G - C S F レセプターの分子量が 10

0,000 - 130,000 であることを示唆している。同様に、ネ

ズミ 125 I - G - C S F と C O S 細胞上で発現したレセプターとの

クロスリンキング反応で分子量 120,000 - 150,000 (レ

ーン4) に主バンドを得、これは N F S - 6 0 細胞に検出した値と

やや異なっている。これらのバンドはクロスリンキング反応を非標

識 G - C S F の存在下 (レーン2および5) 、または結合試薬が存

在しないとき (レーン3) には認められなかった。C O S 細胞と N

F S - 6 0 細胞の分子量に僅かな相違はこれらの細胞系でのレセプ

ターのグリコシル化が相違することで説明することができる。

3) ハイブリダイゼーション

コロニーハイブリダイゼーションとノーザンハイブリダイゼーションを文献記載の方法(マニアティス、Cold Spring Harbor、New York: Cold Spring Harbor Laboratory(1982))に従って行った。プローブとして、クローンp J 17の2.5 kb HindIII-Xba I断片をランダムプライマーラベリング法(ファインバーグおよびボーゲルシュタイン、Anal. Biochem. 13、26-13(1983))により³²Pで標識したものを用いた。ノーザンハイブリダイゼーションの結果を第6図に示す。

ネズミの種々の組織から調製した全RNAまたはpoly(A)RNAを用いた。それらは、L929(レーン1)、NFS-60(レーン2および3)、FDC-P1(レーン4)、WHEI-3BD⁺(レーン5)またはマウス組織、脳(レーン6)、肺(レーン7)、脾臓(レーン8)、骨髄(レーン9)、肝臓(レーン10)、および腎臓(レーン11)である。全RNA 30 μg(レーン1、および3~11)またはpoly(A)RNA 2 μg(レーン2)を6.6%ホルムアルデヒド含有1.3%アガロースゲル電気泳動にかけ、上記の文献記載の方法に従い、

ノーザンハイブリザイゼーションで分析した。

実施例3 クローニングしたネズミ G-CSF レセプター-DNA の

塩基配列および該DNAにコードされているポリペプチドのアミノ

酸配列

1) ヌクレオチド配列決定

DNA配列決定はT7-DNAポリメラーゼ(ファルマシア)およ

び α -³⁵S dATP α S(アマーシャム)を用いるジデオキシヌクレ

オチド鎖決定法で行った。結果を第1図および第2図に示す。

第1図はネズミ G-CSF レセプター cDNA (pI62, pJ

17 および pF1) のヌクレオチド配列およびそれより類推される

アミノ酸配列を示す。各ラインの上下の数字はそれぞれ、ヌクレオ

チド位置およびアミノ酸位置を表し、アミノ酸は成熟 G-CSF レ

セプターの Cys-1 から始まっている。アミノ酸配列でシグナル配

列および膜貫通領域には下線を引いた。2つのオーバーラップした

poly(A)付加シグナル (AATAAA) にも下線を引いて示した。

潜在的なN-アセチルコサミン化部位 (Asn-X-Ser/Thr) (細胞外

領域の11および細胞質領域の2)は箱で囲まれている。

第2図はネズミG-CSFレセプターcDNAであって、Aは3つの独立したcDNA(pI62, pJ17, pF1)の模式図お

よび制限地図である。長方形で囲んだ部分はオープンリーディングフレームである。点描および塗り潰した部分はそれぞれ、シグナル配列および膜貫通領域を表す。制限酵素切断部位も示されている。

BはネズミG-CSFレセプターのアミノ酸配列のヒドロパシープロットであって、これは10残基のウインドウを用いるカイトおよびドゥーライトの方法(1982)によって得られた。図の下の番号は前駆体タンパク質のアミノ酸残基の位置を表す。

2) G-CSFレセプターのアミノ酸配列と他の成長因子レセプターアミノ酸配列との比較(第7図)。

第7(a)図にG-CSFレセプターとプロラクチンおよび成長ホルモンレセプターを並列に示す。ネズミG-CSFレセプターの96-317アミノ酸配列とラットプロラクチンおよびヒト成長ホルモンレセプターとを比較し、幾つかのギャップ(−)を導入して得

られる最大ホモジーを示す。2配列における同一残基は実線で囲み、好ましい (favored) 置換と見なされる残基は破線で囲まれている。好ましいアミノ酸置換は以下のグループのいずれか1つに属する対のアミノ酸間における置換と定義される： S, T, P, A および G ; N, D, E および Q ; H, R および K ; M, I, L および V ; F, Y および W。増殖因子レセプター類 (ファミリー) の 9 メンバー (G-CSF、プロラクチン、成長ホルモン、エレイスロポエチン、GM-CSF、IL-2 β 、IL-3、IL-4 および IL-6) の間で保存されているアミノ酸は、各ラインの下に括弧を付けて、また括弧なしに記載されている。括弧のない残基は 8 以上のメンバーに保存されていたが、括弧をした残基はファミリーの 5 ~ 7 メンバーに保存されていた。

第 7 (b) 図は第 7 (a) 図と同様に、ネズミ G-CSF レセプターの 376-601 アミノ酸配列とニワトリコンタクチンのアミノ酸配列とを並行に示した図である。

第 7 (c) 図はネズミ G-CSF レセプターの 602-808 アミ

ノ酸配列を上記のようにネズミ IL-4 レセプターと並列に記載した図である。

第 7 (d) 図はネズミ G-CSF レセプターの模式図であって、箱で囲んだ範囲は成熟 G-CSF レセプターを表す。“TM”はトランスメンブラン領域、領域“A”は他の成長因子レセプター（プロラクチンおよび成長ホルモンレセプター）と同様のドメイン（222 アミノ酸）を表し、“WSXWS”モチーフが見られる。ネズミ G-CSF レセプターの領域“B”（226 アミノ酸）とニワトリコンタクチンとは類似する。領域“C”（211 アミノ酸）はトランスメンブランドメイン（下線）および G-CSF レセプターの細胞質ドメインを含み、ネズミ IL-4 レセプターの 2 個の領域と類似している。

実施例 4 ヒト G-CSF レセプター cDNA のクローニング

(1) ヒト G-CSF レセプター cDNA クローンの単離

U937 細胞から poly(A) RNA を調製し、逆転写酵素（生化学工業から購入）とアマーシャム社の cDNA 合成キットを用い、文献記載（ナガタら、Nature、319、415～418（1986））の

方法に従って2本鎖cDNAを合成した。得られた平滑末端cDNA

にBstX1アダプターを付加し、1%アガロースゲルで電気泳動し

た。2.5kb以上のcDNAをゲルから回収し、哺乳類発現ベクター

pEF-BOS(第14図)に結合させ、得られたDNAでE.coli

DH1細胞を電気穿孔法(ダウエルら、Nucleic Acids Res.、1

6、6127-6145(1988))を用いて形質転換した。

次いで、得られたライブラリーの合計 3.4×10^4 個のクローン

をコロニーハイブリダイゼーションでスクリーニングした。

ハイブリダイゼーションプローブはネズミG-CSFレセプター

cDNAの2.5kbHindIII-XbaI断片をランダムオリゴヌクレオ

チドプライマー標識法[サンブルック(Sambrook, J.)、フリッツ(F

ritsch, E. F.)およびマニアティス(Maniatis, T.)、モレキュラ

ー・クローニング(Molecular Cloning)(1989)：ア・ラボラ

トリ・マニュアル(A Laboratory Manual)、第2版、コールド・

スプリング・ハーバー、ニューヨーク(Cold Spring Harbor, N

ew York)：コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Col

d Spring Harbor Laboratory)】により³²Pでラベルしたものを用いた。ここで用いたプローブはネズミG-CSFレセプターcDNA(pI 6.2)である。そのスクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を添付の第1図に示す。なお、この第1図においてシグナル配列および膜貫通領域には下線が付されている。また、潜在的なN-アクリル基部位は四角で囲まれている。

ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション温度を28°Cに下げ、フィルターを37°Cにおいて150 mM NaCl/15 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0/0.1% NaDODSO₄で洗浄する。他は文献[フクナガ(Fukunaga, R.)、マツヤマ(Matsuyama, M.)、オカムラ(Okamura, H.)、ナガタ(Nagata, K.)、ナガタ(Nagata, S.)およびソカワ(Sokawa, Y.)、スクレイック・アシックス・リサーチ(Nucl. Acids Res.)、14、4421~4436(1986)]に従って行った。即ち、コロニーのレプリカフィルターを作製し、各ニトロセルロースフィルターと95°Cで5分間加熱後急冷したプローブとを28°Cで12時間ハイブリダイゼーションさせた。次い

で、上記記載の方法でフィルターを洗浄後、オートラジオグラフィーにより目的のクローンを探索した。

他方、 λ gt11を用いて構築されたヒト胎盤cDNAライブラリーをクローンティック(Clontech)社より購入し、ネズミG-CSFレセプターcDNAを用いるブラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。

即ち、約 1.5×10^6 個のクローンのファージDNAをベントンおよびディビスによって記載された方法(Benton, W. D. & Davis, R. W., Science, 196, 180-182(1977))によってニトロセルロースフィルターに移した後、ブラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。用いたプローブDNAおよびハイブリダイゼーション条件は、上記に記載したU983 cDNAライブラリーのスクリーニングに用いたプローブおよび条件と同一である。

U937細胞から調製したcDNAライブラリーから5個の陽性クローンを単離した(pHQ1～pHQ5)。

他方、ヒト胎盤cDNAライブラリー(1.5×10^6 個)とネズミ

G-CSFレセプター-cDNAとのプラークハイブリダイゼーション

において100個以上の陽性シグナルを示すクローニが得られ、

その6個の陽性クローニ(λ HG 4、5、11、12、14および

18)のEcoRI断片をpBluescript SK(+)ベクターにサブクロ

ーンし、pHG 4、5、11、12、14あるいは18と命名した。

DNAの塩基配列決定のために、エキソヌクレアーゼIIIおよびmu

ng beanヌクレアーゼ(サンブルックら、前掲)を用いて約300bp

づつ欠失した一連のプラスミドを調製した。そして、配列決定はT

7DNAポリメラーゼ、deaza dGTPおよび α -³⁵S dATP α -

Sを用い、ジデオキシ鎖ターミネーション法で行なった。

配列決定の結果、U937および胎盤cDNAライブラリーから

単離されたcDNAは以下の3クラスに分類されることが分かった。

クラス1: プラスミドpHQ3(U937)およびpHG12(胎盤)

U937および胎盤cDNAライブラリーから単離された大部分

のcDNAがこのクラスに属する。これらプラスミドの塩基配列お

および推定のアミノ酸配列を第8(a)図に示す。また、その制限酵素切断部位を示す地図を第9図に示す。

これらのクラス1のプラスミドは836アミノ酸からなるタンパク質をコードする大きいオープンリーディングフレームを有している。推定のアミノ酸配列のヒドロパシー分析の結果、図面から明らかなように、N-末端23アミノ酸残基がシグナル配列に相当し、604残基の細胞外ドメイン、26残基の、膜貫通領域、および183残基の細胞質ドメインが続く。この細胞外領域には9個の潜在的N-アセチルグルコサミン化部位が存在する。

また、このcDNAによってコードされているペプチドの細胞外ドメインには17個のシスティン残基が存在し、内14個はヒトおよびネズミで保存されている。また、該ドメインにはサイトカインレセプターで保存されている“WSXWS”モチーフも存在しており、ヒトG-CSFレセプターがサイトカインレセプターに属することが示された。

このクラス1のプラスミドでコードされているヒトG-CSFレ

セプター(813アミノ酸)とネズミG-CSFレセプターの相同性

はヌクレオチド配列レベルで72%、アミノ酸配列レベルで62.

5%であった。また、アミノ酸配列における相同性は分子の全領域

を通して均一であった。

クラス2：プラスミドpHQ2(U937細胞)

プラスミドpHQ2の塩基配列は、pHQ3の配列から、ヌクレオチド番号2,034-2,121の88ヌクレオチドが欠失している

ことを除いてpHQ3のそれと同一である。欠失配列の末端は、第

8(a)図記載の配列の黒い矢頭で示されている。

図から明らかなように、この88ヌクレオチドの欠失領域には膜貫通領域が含まれている。欠失部分から下流のヌクレオチド配列を第8(b)図に示す。

pHQ2においては、欠失部位から下流の150アミノ酸をコードする翻訳リーディングフレームがこの欠失により変化しており(第9図参照)、分泌、可溶化型のG-CSFレセプターをコードしていると考えられる。この可溶化型レセプターは748アミノ酸から

なり、分子量計算値は82,707である。

クラス3：プラスミドpHG11およびpHG5(胎盤)

これらプラスミドのヌクレオチド配列はpHQ3のヌクレオチド

番号2,210位に81bpDNA断片が挿入されたものである。挿

入位置はG-CSFレセプターの細胞質ドメイン内にあり、第8図

Aにおいて太い矢印で表示した部位である。翻訳オープンリーディ

ングフレームは変化していない。挿入体のヌクレオチド配列および

推定の塩基配列を第8(c)図に示す。従ってプラスミドpHQ2にコ

ードされているレセプターは第1クラスのG-CSFレセプターよ

りもアミノ酸数で27、分子量で2,957大きいことになる。

これら3クラスのプラスミドのヌクレオチド配列および推定のア

ミノ酸配列は第8図に記載されている。この図において、Aにおける

pHQ2の配列における種々の記号等は以下の意味を有する。ア

ミノ酸配列の番号はアミノ酸Gluを番号1とするものである。シグ

ナル配列および膜貫通領域は太い下線、N-グリコシル化部位(As

n-X-Thr/Ser)は四角で示されている。サイトカインレセプタ

ーファミリーに保存されている“W S X W S”モチーフ部分は2重下

線で示されている。黒の矢頭はpHQ 2において欠失されている配

列の末端、太い矢印はpHG 1 1における挿入体の挿入部位を表す。

細い矢印は後述のP C R法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

部分を示す。Bにおいて、△から下流の配列は、pHQ 2における、

pHQ 3の欠失されたヌクレオチド2,034から下流の配列に相当

するヌクレオチド配列、および推定のアミノ酸配列を示す。Cはp

HG 1 1に含有されている、pHQ 3のアミノ酸657位への挿入

体のヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列である。挿入され

た配列は括弧で囲まれている。

上記3クラスのプラスミドの制限地図は第9図に示されている。

図中、四角で囲んだ部分はオープンリーディングフレーム、陰影を

付けた部分はシグナル配列、塗りつぶした部分は膜貫通領域を表す。

pHQ 2における斜線部分は他のcDNAのオープンリーディングフ

レームから変化した部分であって、異なるアミノ酸をコードする配

列を表す。pHG 1 1における斜線部分は27アミノ酸をコードす

る挿入体配列部分を表す。

(2) ヒト細胞におけるG-CSFレセプター mRNAの検出

上記cDNAから調製したプライマーを用い、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)法によってヒトG-CSFレセプター mRNAを検出した。

1本鎖cDNAの合成およびPCRは実質上カワサキ[カワサキ(Kawasaki, E. S.)、ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols)、「ア・ガイド・トゥー・メソッズ・アンド・アプリケーション(A guide to methods and application)」、アイニス(Innis, M. A.)、ゲルファンド(Gelfand, D. H.)、シャインスキーリンキー(Shinsky, J. J.)およびホワイト(White, T. J.)ら編、(アカデミック・プレス、サン・ディエゴ、カリフォルニア(Academic Press, San Diego, CA))、21頁~27頁(1990)]の方法に従って行い、結果を第12図に示した。

即ち、ヒト胎盤またはU937細胞から得た全RNA(レーン2および5)またはpoly(A)RNA(レーン21および4)、あるいは

ヒト胎盤(レーン3および6)2 μ gを反応混合物50 μ l中、ランダム6量体(ヘキサマー)0.5 μ gとAMV逆転写酵素80単位の存在下、既述(カワサキら、前掲)の如くし、cDNA合成に付した(カワサキら、前掲)。

反応混合物5 μ lをとり、下記の順(フォワード)および逆(リバース)プライマー各50 pmolを含有するPCRバッファー100 μ lで希釈し、80°Cに予備加熱したDNAサーマルサイクラー(パーキン-エルマー-セタス)中に置いた。

次いで、Tagポリメラーゼ2.5単位を加えて反応を開始した。PCRの条件は以下の通りである。95°Cで1.5分、70°Cで1.5分、72°Cで1.5分、のサイクルを30回行う。

最後に、生成物(反応混合物の10%)をTBEバッファー中、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ臭化エチジウム蛍光で観察した。サイズマーカーとして、BamHIおよびMvaI消化pBR322を同時に電気泳動しDNA断片のサイズを塩基対で示した。単離したDNAに対応する増幅したDNA断片(A1、A2、B1およ

びB 2)を矢印で示した。

第12図において、レーン1～3の試料はヌクレオチド番号1, 790-1,810の順プライマーと2,179-2,156の逆プライマーの組を用いて増幅したものである。レーン4～6は、第2のオリゴヌクレオチド(ヌクレオチド番号2,086～2,105および2,322～2,303)を特異的プライマーとして増幅した試料である。

図から明らかなように、U937および胎盤細胞のいずれもクラスIG-CSFレセプターを発現し、U937細胞は可溶性G-CSFレセプターを発現し、さらに、胎盤細胞は細胞質領域に挿入体を有するG-CSFレセプターを発現することが確認された。

実施例5 クローニングしたヒトG-CSFレセプターcDNAによるCOS細胞の形質転換および形質転換体の結合活性ネズミ¹²⁵I-G-CSFと実施例4で得たcDNAで形質転換されたCOS細胞との結合を調べた。

ネズミ組換えG-CSFの標識化、ヒトG-CSFレセプター-c

D N Aを含有する発現ベクターによるC O S細胞の形質転換、および¹²⁵I-G-CSFのC O S細胞への結合アッセイは前述のネズミの実施例で開示した方法に従って行った。

プラスミドpH G 1 1を用いて、細胞質領域に挿入体を有する完全長さのcD N Aを構築した。即ち、プラスミドpH G 1 1を制限酵素(Nhe I、宝酒造より購入)完全消化、BstXI(1,425)(宝酒造より購入)部分消化した。制限酵素の反応条件は、宝酒造からの酵素に添付されている反応条件に従った。

次いで、1.38kb BstXI-Nhe I断片とpHQ 3の6.9kb BstXI-Nhe I断片とをT 4-D N Aリガーゼ(宝酒造より購入)を用いて結合させてpQW 1 1を構築した。そして、これらのcD N Aを含有する発現プラスミド(pHQ 2、pHQ 3およびpQW 1 1)でC O S細胞を形質転換し、¹²⁵I-G-CSFに対する結合を検討した。

即ち、15cmのプレート上で培養したC O S細胞と、20μgのpHQ 2、pHQ 3またはpQW 1 1でトランスフェクションした。グ

リセリンショク後、12時間後に6ウエルのマイクロタイタープレートに分割して入れ、10%FCS含有DMEM中、60時間培養した。細胞を結合培地(10%FCSFおよび20mM HEPES(pH 7.3)含有DMEM)で洗浄し、種々の量の¹²⁵I-G-CSF(10pM~1.2nMの範囲)と一緒に4℃で4時間インキュベートした。¹²⁵I-G-CSFと細胞の非特異的結合を測定するために、大過剰の非標識G-CSF(800nM)の存在下で結合反応を行い、全結合活性から非特異的に結合した放射活性を差し引くことにより特異的結合活性を求めた。第10図Aは、¹²⁵I-G-CSFのCOS細胞への飽和結合活性、第10図Bはそのスキャッチャード解析の結果を示す。この際、ネズミG-CSFレセプターcDNAも同様にCOS細胞へ導入し、G-CSFの結合活性を検討した。

第10図において、▲はネズミG-CSFレセプターcDNAで形質転換されたCOS細胞を示す。そしてヒトG-CSFレセプター-cDNAで形質転換されたCOS細胞の内、pHQ3による形質転換体は○、pHQ2による形質転換体は△、pQW11による形質転

換体は△で示されている。

第10図から、pHQ3あるいはpHQ11で形質転換されたサル

COS細胞はネズミ¹²⁵I-G-CSFと高い親和性を有し、結合

における解離定数は550pM、レセプター数は 3.4×10^4 個/

細胞であることが分かる。また、pHQ2cDNAで形質転換された

COS細胞とネズミ¹²⁵I-G-CSFとの結合は、プラスミドpH

Q2が一部を欠失したペプチドをコードしていることから、極めて

低レベルであった(解離定数440pM、結合部位 6×10^3 /細胞)。

このことは膜貫通領域を欠くpHQ2によりコードされたレセプタ

ーは細胞から分泌され、培地中に蓄積されている可能性を強く示唆

している。

また、プラスミドpQW11による形質転換体とpHQ3による形

質転換体がほぼ同等のネズミ¹²⁵I-G-CSFに対する結合活性

を示すことは、細胞質ドメインにおける27アミノ酸挿入体がG-

CSFの結合に殆ど影響していないことを示している。

なお、形質転換体の発現により取得されるヒトG-CSFレセプ

ターの精製については、前述の天然のマウスG-CSFレセプターの精製方法を使用することができる。

実施例6 ヒトG-CSFレセプターをコードするDNAおよびmRNAの分析

ノーザンハイブリダイゼーションおよびサザーンハイブリダイゼーションにより、ヒトG-CSFレセプターをコードするDNAまたはRNAを分析した。

全RNAは種々の細胞系統および新鮮なヒト臨月胎盤から既述(サンブルック、前掲)のごとくグアニジンイソチオシアネート/CsCl法を用いて調製した。

他方、細胞DNAはヒトTリンパ球から、文献(フクナガら、Nucleic Acids Res.、14、4421-4436(1986))に記載された方法に従い調製した。

サザーンおよびノーザンプロットハイブリダイゼーションはヒトG-CSFレセプターcDNAを含有するプラスミドpHQ3のXba I DNAフラグメント(3kb)をプローブとして、文献記載の方法(マ

ニアティスら、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory(1982)に従って行なった。

1) G-CSF レセプター転写物およびゲノムDNAの分析

種々の細胞からのmRNAをネズミG-CSF レセプターcDNAをプローブとするノーザンハイブリダイゼーションにより試験した。

結果を第11図に示す。用いた細胞は以下の通りである。ヒトU937細胞(レーン1および2)、ヒトKG-1(レーン3)、ヒトHL-60(レーン4)、ヒトFL(レーン6)、ヒトCHU-2(レーン7)、およびヒト胎盤(レーン5および8)。

U937 : human histiocytic lymphoma, ATCC CRL 15

93

KG-1 : human acute myelogenous leukemia, ATCC CC

L246

HL-60 : human promyelocytic leukemia, ATCC CCL

240

FL : human amnion, ATCC CCL 62

また、レーン2～6および8は全RNA(20 μg)、レーン1および7はpoly(A)RNA(1 μg)を表す。

第11図Aは、ヒトG-CSFレセプターcDNAをDNAプローブとし、ハイブリダイゼーション後フィルターをX線フィルムに40時間、感光させて得た像の模写図である(ただし、レーン8は2時間)。

U937、胎盤およびKG-1から得たRNAでは3.7kbに単一のバンドが観察される。しかも、胎盤由来のRNAに検出されたシグナルはU937由来RNAにおけるその20倍以上である。

Bは、プロットを再度、³²P標識ヒト延長因子(エロンゲーションファクター)1αcDNA[ウエツキ(Uetsuki, T.)、ナイトウ(Naito, A.)、ナガタ(Nagata, S.)およびカジロ(Kaziro, Y.)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、264、5791～5798(1990)]によるハイブリダイゼーションに付し、フィルターをX線フィルムに1時間感光させて得た像の模写図である。この場合には、どの細胞から調製した

R N A も殆んど同様のシグナルが得られた。これらの結果は胎盤が G - C S F レセプターの mRNA を非常に大量に発現していることを示しており、G - C S F の胎盤成長促進作用を示唆するものである。

2) サザーンハイブリダイゼーション

サザーンハイブリダイゼーション法によりヒト G - C S F レセプターをコードする遺伝子の数を検討した。

ヒトゲノムDNA 10 μ gをEcoRI、HindIII、BamHI、BglII、XbaI、PstI、SacI およびApaIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけた。DNAをニトロセルロースフィルターに移し、 32 P標識ヒト G - C S F レセプター-cDNAとハイブリダイズした。この際、DNAサイズマーカーを同時に泳動した。

結果を第13図に示す。図はEcoRI(レーン1)、HindIII(レーン2)、BamHI(レーン3)、BglII(レーン4)、XbaI(レーン5)、PstI(レーン6)、SacI(レーン7)およびApaI(レーン8)の各消化断片に関する分析結果を示すものである。制限酵素EcoR

I、HindIII、BglII、およびXbaIで消化したDNAには1～2個のバンドしか認められないが、BamHI、PstI、SacI、およびApaIで消化したDNAはそれぞれ4～5個のバンドが認められる。第9図記載のごとく、ヒトG-CSFレセプターcDNAは3BamHI、6PstI、2SacI、および3ApaI制限酵素切断部位を有するので、この結果よりヒトハプロイドゲノムあたり1個のG-CSFレセプター遺伝子が存在すると推定される。

図面の簡単な説明

第1図はネズミG-CSFレセプターのヌクレオチド配列およびそれより類推されるアミノ酸配列の模式図、第2図はネズミG-CSFレセプターcDNA(pI62、pJ17およびpF1)の模式図、制限地図およびヒドロパシープロットを示すグラフ、第3図は組換えネズミG-CSFを発現するCOS細胞およびNFS-60細胞とネズミ¹²⁵I-G-CSFとの結合を示すグラフであって、Aはネズミ¹²⁵I-G-CSFとCOS細胞との飽和結合、BはCOS細胞へのネズミG-CSF結合データのスキッチャードプロット

を示すグラフ、Cはネズミ¹²⁵I-G-CSFのNFS-60細胞

への飽和結合を示すグラフ、DはNFS-60細胞へのネズミG-

CSF結合データのスキャッチャードプロットを示すグラフ、第4

図はCOS細胞で発現された組換えネズミG-CSFレセプターと

ネズミG-CSFとの結合特異性を表すグラフ、第5図はCOS細

胞およびNFS-60細胞で発現されたネズミG-CSFレセプター

のクロスリンキング反応の結果を表すグラフ、第6図はネズミG-

CSFレセプターmRNAのノーザンハイブリダイゼーション分析

の結果を表す写真の模写図、第7図はネズミG-CSFレセプター

のアミノ酸配列と他の成長因子レセプターアミノ酸配列とを対比さ

せて示した配列図およびネズミG-CSFレセプターの模式図であ

る。

第8図はヒトG-CSFレセプターをコードするcDNAのヌク

レオチド配列および推定のアミノ酸配列であって、Aはプラスミド

pHQ3およびpHG12のヌクレオチド配列および推定のアミノ酸

配列、BはpHQ2の配列の内、pHQ3の配列と異なる配列部分で

あって、pHQ 3 のヌクレオチド番号 2,034 から下流に相当する

配列のヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列、C は pHG 1

1 の配列の内、pHQ 3 に挿入されている挿入体のヌクレオチド配

列および推定のアミノ酸配列の模式図である。第 9 図は第 8 図記載

の pHQ 3 および pHG 12、pHQ 2、並びに pHG 11 の制限酵素

地図の模式図である。第 10 図は COS 細胞により発現された組換

えヒト G-CSF レセプターのネズミ G-CSF との結合特性を示

すグラフであり、A は ^{125}I - G-CSF の COS 細胞への飽和結

合を示すグラフ、B は G-CSF 結合データのスキャッチャード解

析の結果を示すグラフである。第 11 図はヒト G-CSF レセプタ

- mRNA のノーザンハイブリダイゼーション分析の結果を示す写

真の模写図である。第 12 図はヒト G-CSF レセプター mRNA

の PCR における結果を示す写真の模写図である。第 13 図はヒト

G-CSF レセプターのサザーンハイブリダイゼーション分析の結

果を示す写真の模写図、第 14 図は発現ベクター pEF-BOS の

模式図である。

請求の範囲

1. 顆粒球コロニー刺激因子レセプターをコードするDNA。
2. 顆粒球コロニー刺激因子レセプターがマウス顆粒球コロニー刺激因子レセプターである請求項1記載のDNA。
3. 第1図記載のアミノ酸配列の全部または一部をコードする請求項2記載のDNA。
4. 顆粒球コロニー刺激因子レセプターがヒト顆粒球コロニー刺激因子レセプターである請求項1記載のDNA。
5. 第8図記載のアミノ酸配列の全部または一部をコードする請求項4記載のDNA。
6. 第1図記載のアミノ酸配列によって示される顆粒球コロニー刺激因子レセプターおよびその断片。
7. 第8図記載のアミノ酸配列によって示される顆粒球コロニー刺激因子レセプターおよびその断片。
8. 請求項1記載のDNAを含有する発現ベクター。

9. 請求項 8 記載のベクターを含有する形質転換体。

10. 請求項 9 記載の形質転換体を培地に培養し、得られた培養

物から顆粒球コロニー刺激因子レセプターを単離することからなる

顆粒球コロニー刺激因子レセプターの製造方法。

Fig. 1 (a)

2/21

Fig. 1 (b)

Fig. 1 (c)

Fig. 2

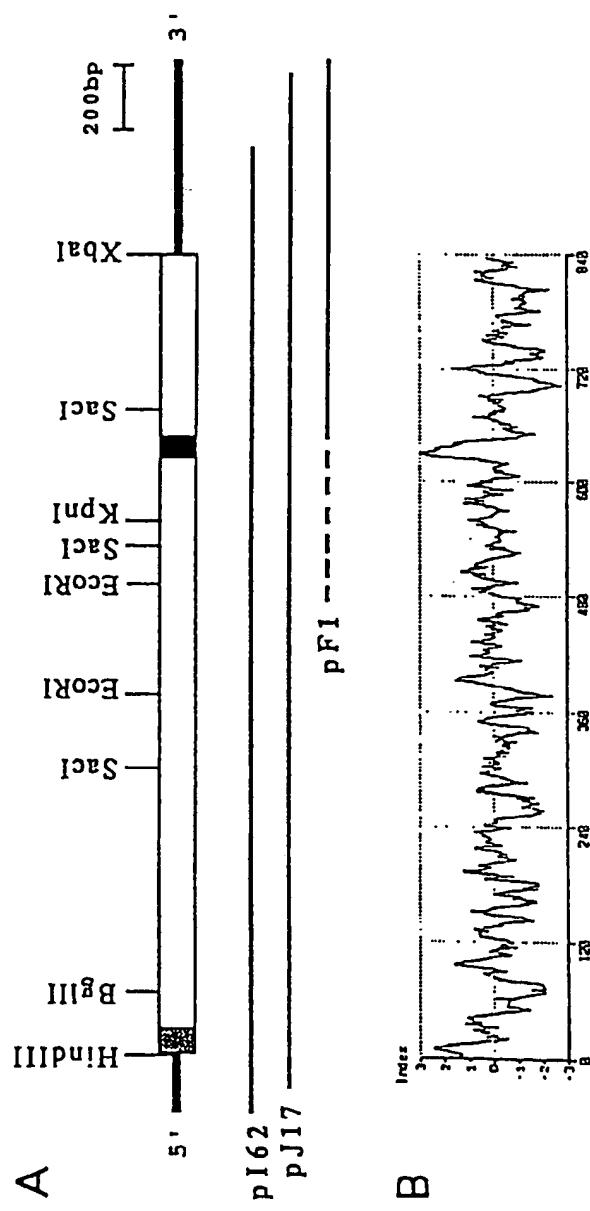


Fig. 3

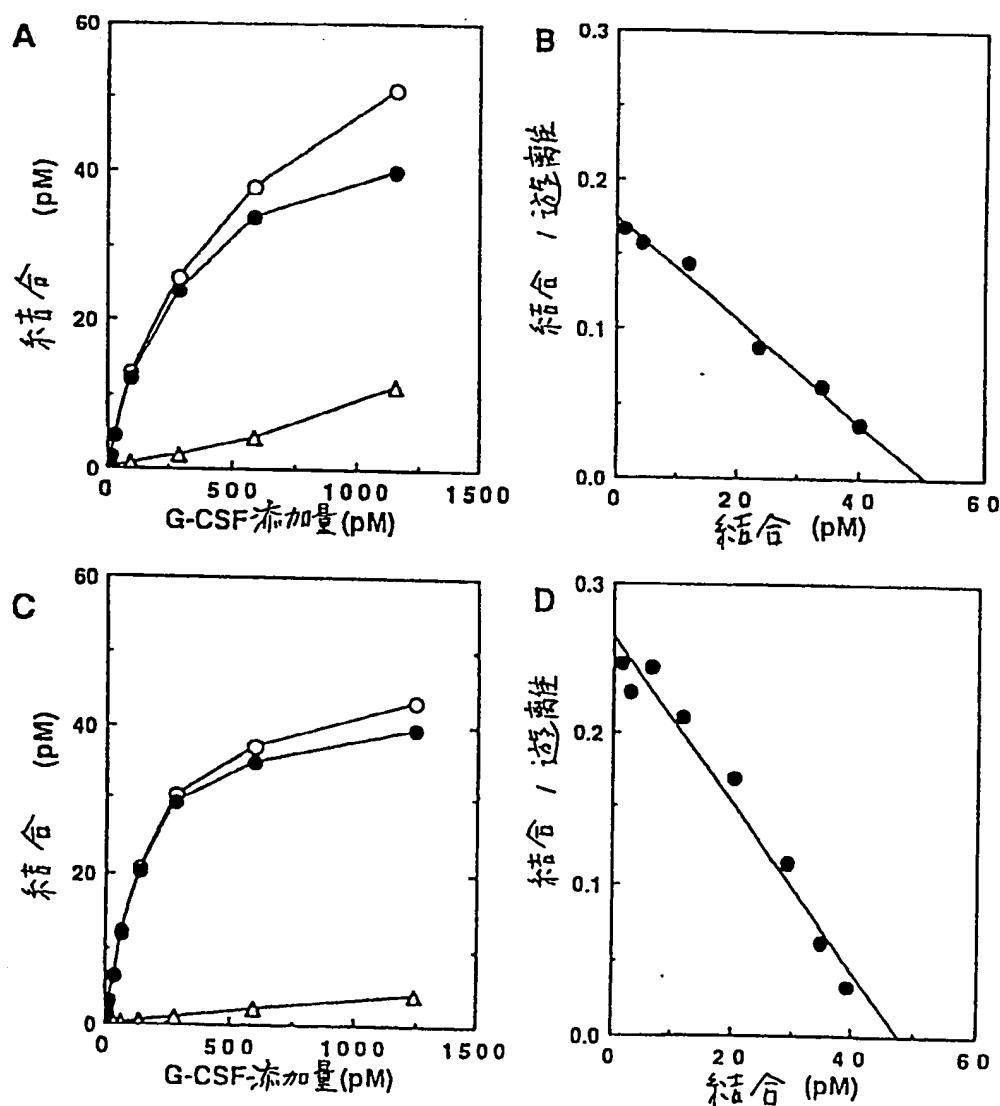


Fig. 4

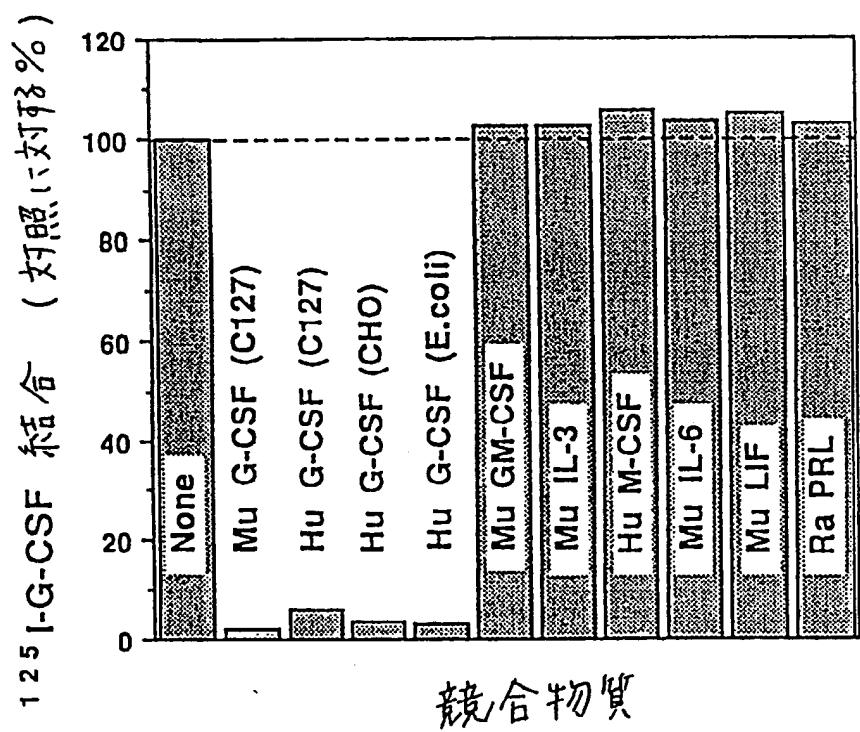
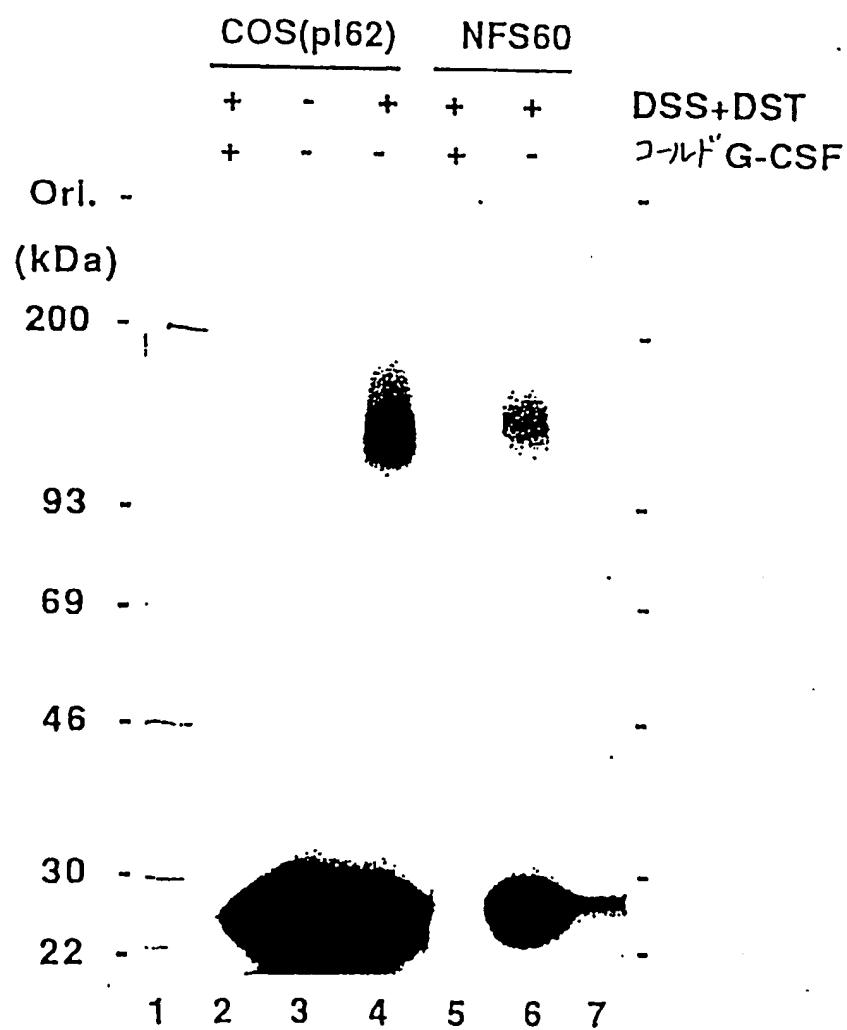


Fig. 5



8/21

Fig. 6

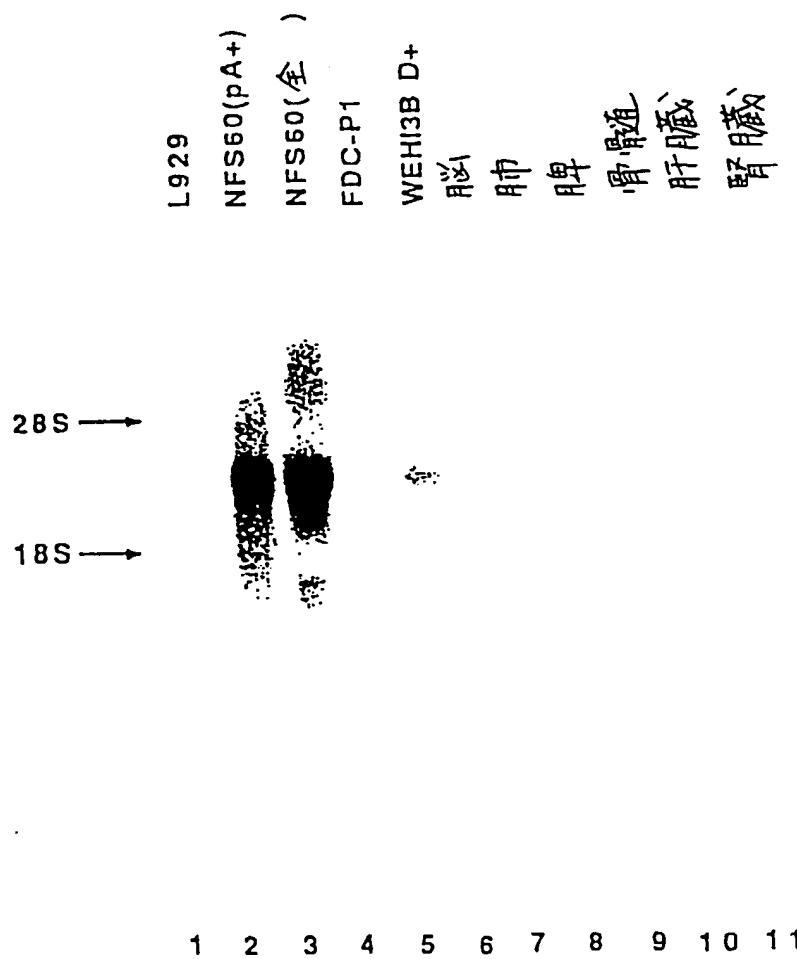


Fig. 7 (a)

Fig. 7 (b)

G-CSFR (376) L P S E A Q N V T I V A Y N K A G T S S - P T T V V F L E N E G P A - V T G I H A M A Q D L N
 CONTAC (745) M P P S T Q Y Q V K V R A E N S K G D G B F S L T A V I Y S A Q D A P T E V P T D V S V K V L S S S

 G-CSFR (422) T I W V D W E A P S I L P - Q G Y L I E - W E M S S P S Y N N S Y K S W M I E P N G N I T G I L L K
 CONTAC (795) E I S V S W H H V T E K S V E G Y Q I R Y W A - - - A H D K E A A Q R V Q V S N Q E Y S T K L -

 G-CSFR (470) D N I N P F Q L Y R I T V A P L Y P G I V G P P V N V Y T F A G E R A P P H A P A L H I K H V - G T
 CONTAC (840) E N L K P N T R Y H I D V S A F N S A G Y G P P S Q R P R I I S V R S G

 G-CSFR (519) T W A Q L E W V P E A P R L G M I P L T B Y T I F W A D A G D H S F S V T L N I S L H D F V I K H L
 CONTAC (890) S R Y I I T W D H V R A M S N E S A V E G Y K Y L Y R P D G Q H E - G K L F S T G R H T I E V - P V

 G-CSFR (569) E P A S I L Y H V Y L M A T S R A G S T N S T G I T L R T L D P S D
 CONTAC (938) P S D G E Y V V E Y R A H N E G G D G E V A Q I R I S G A T A G V

Fig. 7 (c)

G-CSFR (602) **L** N I F E L G I L C L V I L L S T . T C V V T W L C C R R G K T S F W S D V P D P A H S S L S S W L P T
 IL-4R (209) **L** P I G V T I S C L C I P L F C L F C T E S I T K I K J K I - - W W D Q I P T P A R S P L - - - V A

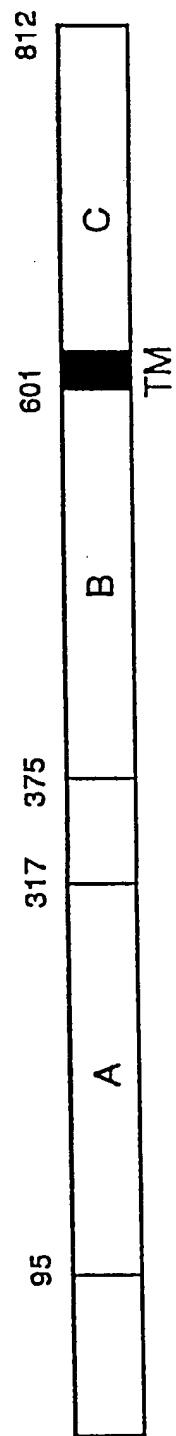
 G-CSFR (652) **I** M T E E T F Q I I P S F W D S S V P S I Q - - - 286 a. a. - - -
 IL-4R (253) **I** I I Q D A - Q V P - L W D Q T R S Q - - - 286 a. a. - - -

G-CSFR (672) **T** K I T E L E E D K K P T H W D S E S S G N G S L P A T V Q A Y V I Q G D P R E I S N Q S Q P P S R
 IL-4R (557) **V** K Q G A A Q D P G V P G V R P S G D P G Y K A F S S L L S S N G I R G D T - - - A A A G I T D D G H

 G-CSFR (722) **T** G D Q V L Y G Q V - L E S P I S P G V M Q Y - I I R S D - S T Q P L L G C P T P S P K S Y E N T W F
 IL-4R (604) **G** G Y K P F Q N P V P N Q S P S V P L F T E G L D T E L S P S P L N S D P P K S P P E C L G L E L

G-CSFR (769) **H** S R P Q E T F V P O P P N Q E D D C V F G P P F D E P - L E Q G L Q V H G V E E
 IL-4R (654) **G** L K G G D W V K A P P P A D Q V P K P F G D D L G E G I V Y S S I T C H L C G H

Fig. 7 (d)



13 / 21

Fig. 8 (a)

4

14/21

Fig. 8 (a)

Fig. 8 (c)

B

2024 TG ACC CCA GCC CCA ACA GGA AGA ATC CCC TCT GGC CAA GTG TCC CAG ACC CAG CTC ACA GCA GGC TCG GCT CCT GGG TGC CCA CAA TCA TGG AGG AGG ATG CCT
 596 Leu Thr Pro Ala Pro Thr Gly Arg Ile Pro Ser Gly Gln Val Ser Gln Thr Gln Leu Thr Ala Ala Trp Ala Pro Gly Cys Pro Gln Ser Thr Arg Arg Met Pro
 2129 TCC AGC TCC CGG CCC TTG GCA CGC CAC CCA TCA AGC TCA CAG TGC TGG AGG ATG AAA AGA AGC CGG CCT GGG AGT CCC ATA ACA GCT CAG AGA CCT
 631 Ser Ser Cys Pro Ala Leu Ala Arg His Pro Ser Pro Ser Gln Cys Trp Arg Arg Ser Arg Cys Pro Gly Ser Pro Ile Thr Ala Gln Arg Pro
 2234 GTG GCC TCC CCA CTC TGG TCC AGA CCT ARG TGC TCC AGG CGG ACC CAA GAG CAG TTT CCA CCC AGC CCC ATC CCT CGA CCA GGG ATC AGG TCC TTT ATG
 666 Val Ala Ser Pro Leu Trp Ser Arg Pro His Cys Ser Arg Gly Thr Gln Gln Phe Pro Pro Ser Pro Asn Pro Ser Leu Ala Pro Ala Ile Arg Ser Phe Met
 2339 GGC AGC TCC TGG GCA GCC CCA CAA CCC CAG GGC CAG GGC ACT ATC TCC GCT GTG ACT CCA CTC AGC CCC TCT TGG CGG GCC TCA CCC CCA CCT CCT ATG
 701 Gly Ser Cys Trp Ala Ala Pro Gln Ala Gln Gly Gln Gly Thr Ile Ser Ala Val Thr Pro Leu Ser Pro Ser Thr Arg Ala Ser Pro Pro Ala Pro Ser Pro Met
 2444 AGA ACC TCC GGT TCC AGG CCA GCC CCT TGG GGA CCC TGG TAA CCC CAG GGG CCA AGCC CAG GAG GAC TGT GTC TTT GGG CACT GTC TTT GGG CACT GTC
 736 Arg Thr Ser Gly Ser Arg Pro Ala Pro Trp Gly Pro Trp End

C

2201 ATG GAG GAG [CTG CCC GGA CCC AGA CAG GGA CAG GCA CAG GCA TCT GAA ATG AGC CGT CCT CTC ACC CCA CTA CCT CCT TGT GTC CAG GAT GCC TTC
 655 Met Glu Glu [Leu Pro Gly Pro Arg Gln Gln Trp Leu Gly Gln Thr Ser Glu Met Ser Arg Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Val Gln] Asp Ala Phe

Fig. 9

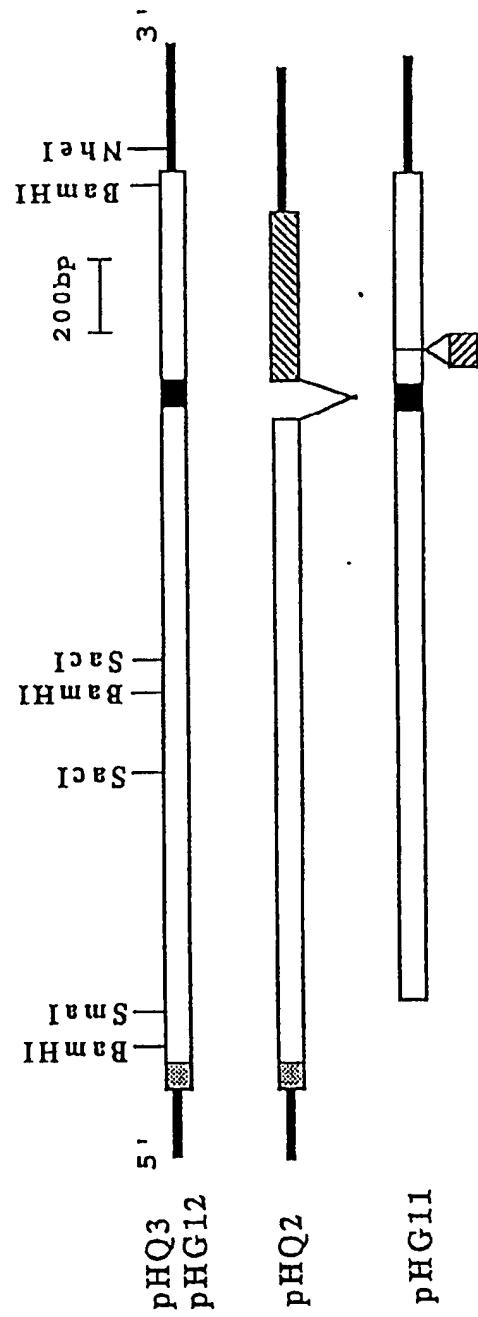
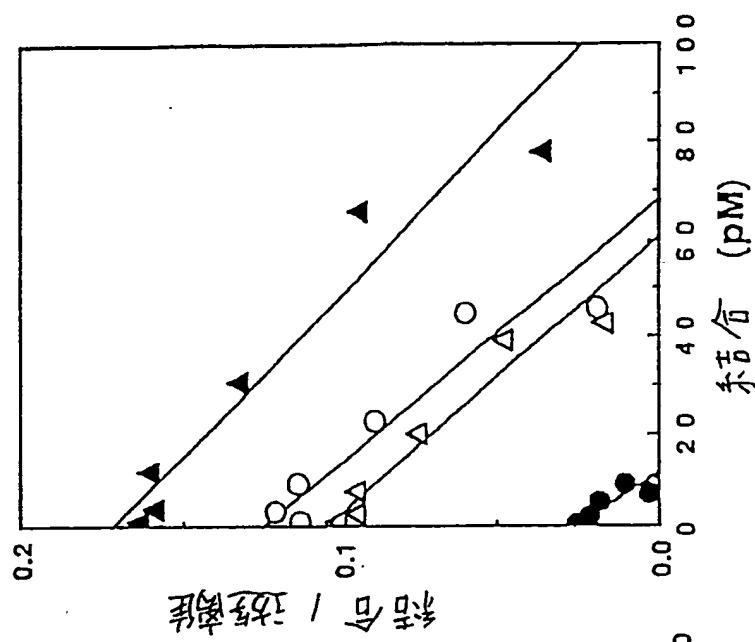


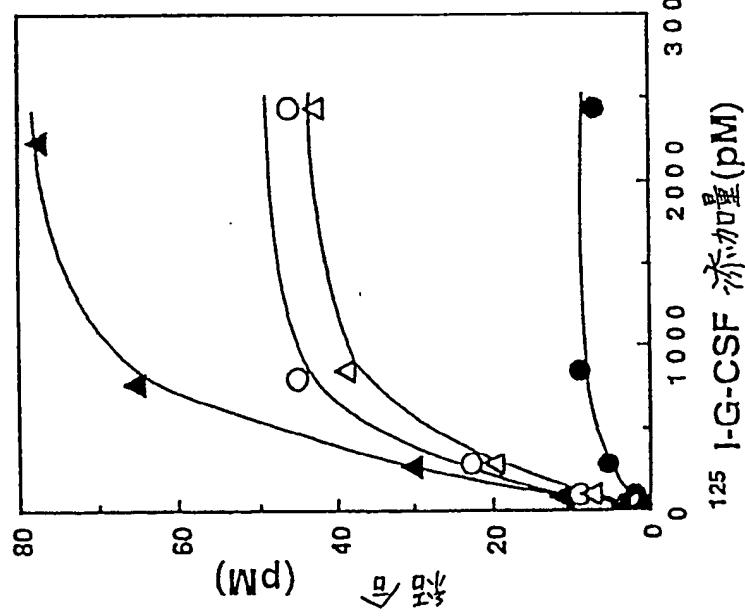
Fig. 10

B



結合率 / 放射活性

A



結合率 / 放射活性

Fig. 11

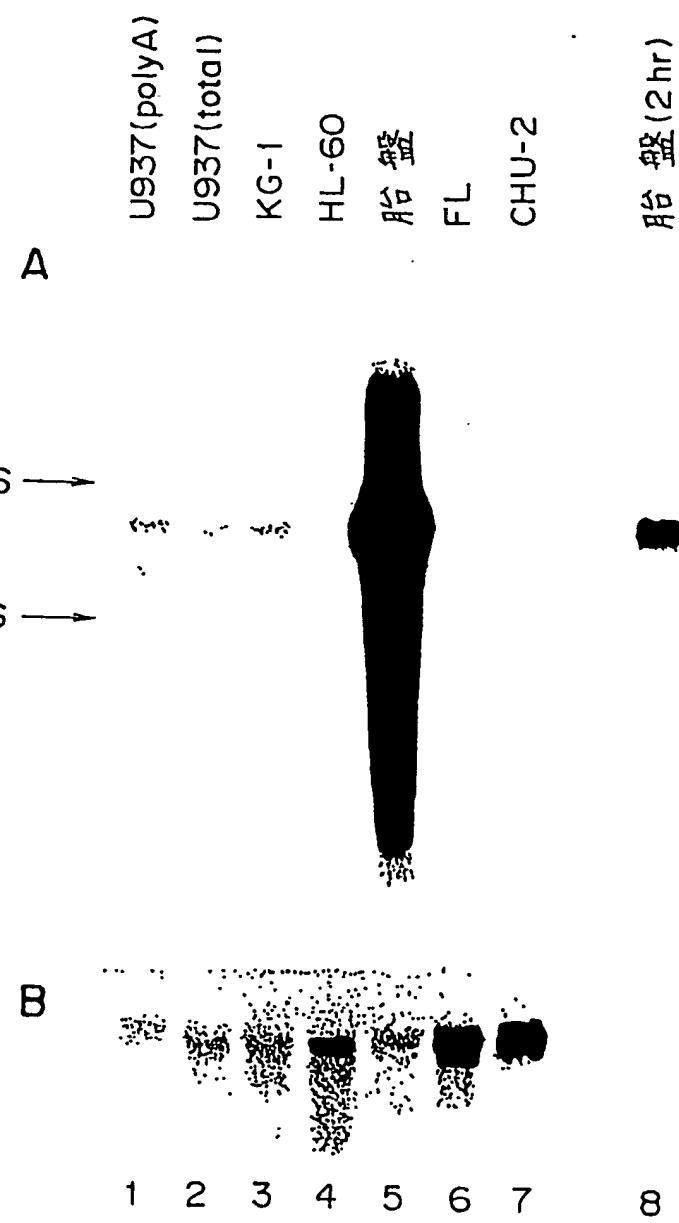


Fig. 12

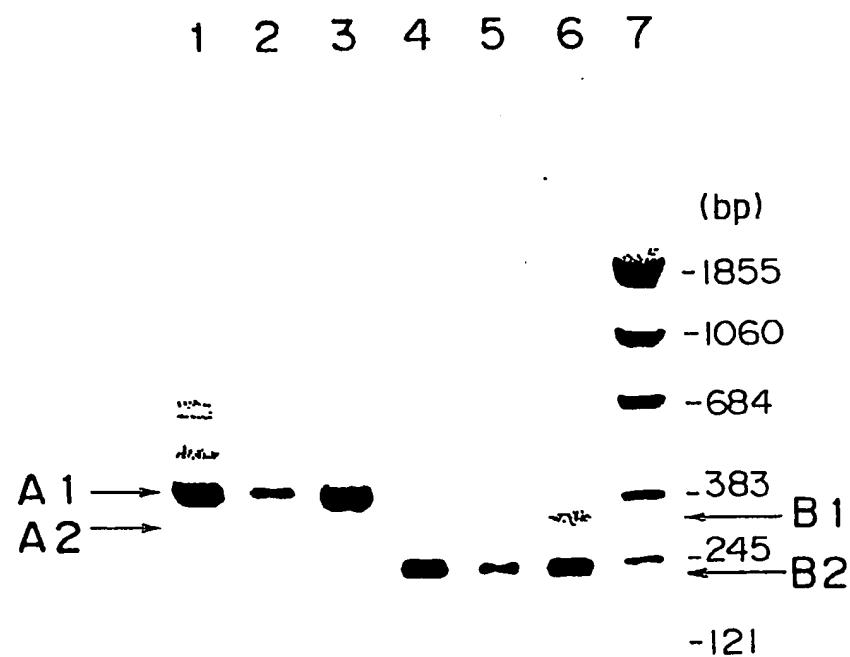


Fig. 13

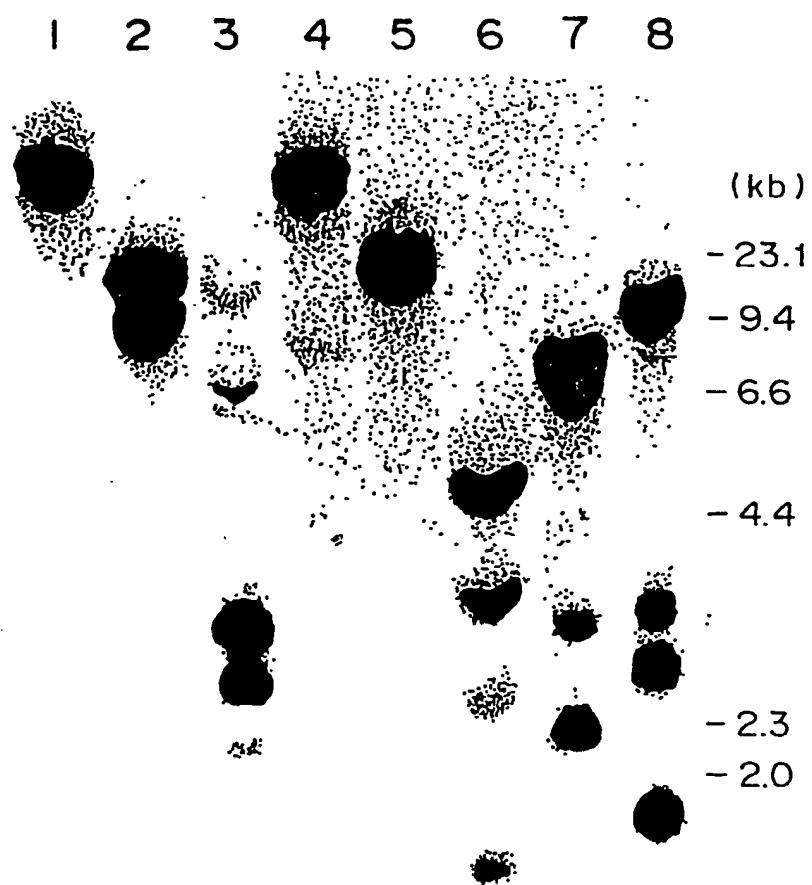
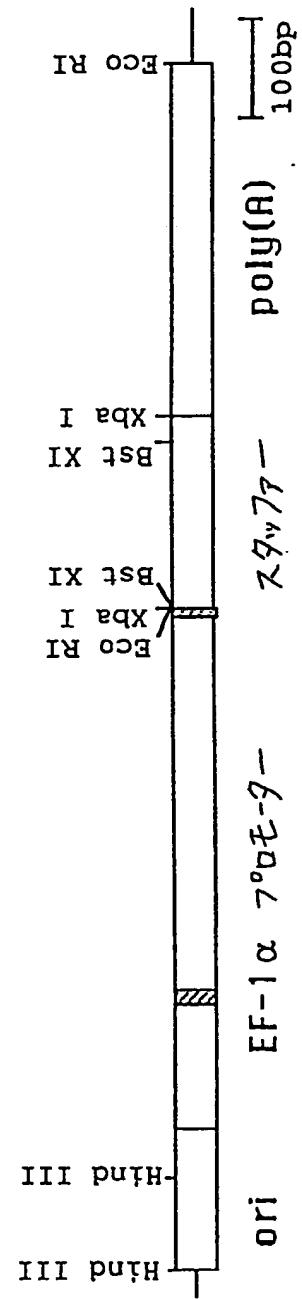


Fig. 14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00375

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl⁵ C12N15/12, 5/10, C12P21/02, C07K13/00//
(C12P21/02, C12R1:91)

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

| Classification System | Classification Symbols |
|-----------------------|---|
| IPC | C12N15/00-15/90, C12N5/00-5/10, C12P21/00-21/06, C07K13/00 |

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

BIOSIS DATA BASE

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹

| Category ¹⁰ | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
|------------------------|---|-------------------------------------|
| X, P | PNAS, Vol.87 (1990), Fukunaga R. et al., "Three Different Messenger RNAs Encoding Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor" p.8702-8706 | 1, 4-5, 7-10 |
| X, P | Cell, Vol.61 (1990), Fukunaga R. et al., "Expression Cloning of a Receptor for Murine Granulocyte Colony-Stimulating Factor" p.341-350 | 1-3, 6, 8-10 |
| A | Blood, Vol.74 (1989), Budel LM. et al., "Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptors in Human Acute Myelocytic Leukemia" p.2668-2673 | 1, 4-5, 7-10 |

* Special categories of cited documents: ¹⁰
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "E" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

| | |
|---|---|
| Date of the Actual Completion of the International Search | Date of Mailing of this International Search Report |
| June 14, 1991 (14. 06. 91) | July 1, 1991 (01. 07. 91) |
| International Searching Authority | Signature of Authorized Officer |
| Japanese Patent Office | |

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 91/ 00875

I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類 (IPC)

Int. CL: C12N15/12, 5/10, C12P21/02,
C07K18/00 (C12P21/02, C12R1:91)

II. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料

| 分類体系 | 分類記号 |
|------|---|
| IPC | C12N15/00-15/90, C12N5/00-5/10, C12P21/00-21/06, C07K18/00 |

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

BIOSIS DATA BASE

III. 関連する技術に関する文献

| 引用文献の カテゴリー | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 請求の範囲の番号 |
|----------------|---|-----------------|
| X, P | PNAS, 第87巻(1990) Fukunaga R et al. [Three Different Messenger RNAs Encoding Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor] p. 8702-8706 | 1, 4-5, 7-10 |
| X, P | Cell, 第61巻(1990) Fukunaga R et al. [Expression Cloning of a Receptor for Murine Granulocyte Colony-Stimulating Factor] p. 341-350 | 1-8, 6, 8-10 |
| A | Blood, 第74巻(1989) Budel LM et al. [Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptors in Human Acute Myelocytic Leukemia] p. 2668-2678 | 1, 4-5, 7-10 |

※引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の
 日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリーの文献

IV. 認 証

| | |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 国際調査を完了した日 14. 06. 91 | 国際調査報告の発送日 01.07.91 |
| 国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP) | 権限のある職員 特許庁審査官 清水初志 4 B 8717 |

第1ページから続く情報

クローニングされた、G-CSFレセプターのDNAを宿主細胞に導入し発現させることによって、基礎研究、臨床応用共に有用なG-CSFレセプターの安定的な供給が可能となった。